

Université de Montréal

Implication de polymorphismes génétiques dans la prédisposition des humains à l'insuffisance
cardiaque et leur réponse au traitement pharmacothérapeutique.

Par

Marcin Zakrzewski-Jakubiak

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie
en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques
option pharmacologie

Novembre, 2010

© Marcin Zakrzewski-Jakubiak, 2010.

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Cette Thèse intitulée :

Implication de polymorphismes génétiques dans la prédisposition des humains à l'insuffisance
cardiaque et leur réponse au traitement pharmacothérapeutique.

présentée par :

Marcin Zakrzewski-Jakubiak

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Line Labbé

Président-rapporteur

Jacques Turgeon

Directeur de recherche

Marc Servant

Membre du jury

Paul Poirier

Examineur externe

Teresa Kus

Représentant de la faculté des études supérieures

Résumé français

Le système cardiovasculaire est composé d'un cœur qui pompe régulièrement le sang à travers des artères afin d'alimenter tous les tissus corporels en oxygène et nutriments qui leur sont nécessaires. Une caractéristique particulière de ce système est son aspect fermé, où le sang fait un cycle constant commençant par le ventricule gauche, allant vers tous les tissus corporels, revenant vers le cœur et le ventricule droit, étant propulsé vers la circulation pulmonaire en retournant au ventricule gauche. L'insuffisance cardiaque est alors une incapacité du cœur à effectuer sa tâche de pomper le sang efficacement. Une série d'ajustements sont alors enclenchés pour rétablir un débit sanguin adéquat; cette réponse systémique est principalement menée par le système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi que par le système adrénergique. À court terme, le flot sanguin est rétabli et le métabolisme corporel continue comme si rien n'était, de telle sorte que, souvent ce stade passe inaperçu et les individus qui en sont affectés sont asymptomatiques. Cependant, le cœur doit alors fournir un effort constant supérieur et si la cause n'est pas résolue, la condition cardiaque se dégradera encore plus. Si tel est le cas, pour s'ajuster à cette nouvelle réalité, le cœur, comme tout muscle, deviendra plus massif et changera de conformation afin de répondre à sa nouvelle charge de travail. Cette transformation cardiaque est communément connue sous le terme de remodelage. Par contre, le remodelage cardiaque est délétère à long terme et entrave encore plus le cœur à bien effectuer sa tâche. Au fur et à mesure que la fonction cardiaque décline, les systèmes compensatoires persistent et s'intensifient; il y a alors établissement d'un cercle vicieux destructeur qui ne peut être renversé que par une transplantation cardiaque. Entre temps, des thérapies inhibant le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système adrénergique se sont avérés très efficaces pour prolonger la survie, diminuer la mortalité, réduire les hospitalisations ainsi que soulager la symptomatologie associée à l'insuffisance cardiaque. Par

contre, ces régimes thérapeutiques ne semblent pas induire une réponse positive chez tous les patients, de sorte que certains n'en retirent pas de bénéfices tangibles, tandis que d'autres éprouvent plusieurs difficultés à les tolérer. Suite à des analyses rétrospectives, surtout en comparant la réponse thérapeutique entre des populations de diverses ethnies, les variations génétiques, particulièrement les polymorphismes ayant le potentiel de moduler le mécanisme d'action de la pharmacothérapie, furent proposés comme responsables de cette variabilité dans la réponse aux médicaments. Certains ont aussi proposé que certains polymorphismes pourraient être considérés comme des facteurs de risque prédisposant à l'insuffisance cardiaque ou coupables de moduler sa progression en tant que facteurs aggravants ou atténuants. Avec de telles hypothèses proposées, plusieurs associations génétiques furent étudiées en commençant par des gènes directement impliqués dans la pathogénèse de cette maladie. Dans le cadre de cette thèse, nous allons revoir les diverses données disponibles dans la littérature au sujet de l'influence que peuvent avoir les divers polymorphismes impliqués dans la prédisposition, la progression et la pharmacogénétique de l'insuffisance cardiaque.

Mots Clés: insuffisance cardiaque, polymorphisme génétique, carvedilol, β -bloqueur, système rénine-angiotensine-aldostérone,

Résumé anglais

The cardiovascular system is composed of a heart that regularly pumps blood through the arteries in order to meet the peripheral tissues' demand for oxygen and nutrients. One particularity of this system is its closed aspect where the blood constantly travels in a circular fashion: starting from the left ventricle it is thrust towards the body tissues, returns to the right side of the heart, is propelled through the pulmonary circulation by the right ventricle and returns again to its starting point, the left ventricle. Heart failure is then the incapacity of the heart to perform its task of appropriately pumping blood. A series of adjustments are then put in place in order to restore an adequate blood flow; this systemic response is mainly lead by the renin-angiotensin-aldosterone and the adrenergic systems. In the short term, the proper blood flow is re-established and the body's metabolism is mainly not affected. This initial stage goes frequently unnoticed and the affected individuals are essentially asymptomatic. However, the heart now needs to deliver a constantly elevated effort and if the precipitating cause is not resolved, the cardiac condition will degrade even further. If this is the case, to adjust itself to this new state, as would any muscle, the heart will become more massive and change its conformation in order to respond to this new workload. This transformation of the heart is commonly referred to as remodelling. However, in the long run, this cardiac remodelling is detrimental and hinders even further the ability of the heart to effectively perform its task. As the cardiac function declines, the compensatory systems persist and intensify; a destructive vicious cycle is then established which will ultimately lead to a heart transplantation or death. In the meantime, therapies inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone and the adrenergic systems were found to be very effective in prolonging lifespan, diminishing mortality, reducing hospitalisations and relieving some of the symptomatology associated with heart failure. However, these therapeutic strategies do not seem

to induce a positive response in all, thus some patients do not derive any tangible benefits, whereas others experience many difficulties in tolerating them. Following retrospective analysis, especially when comparing the therapeutic response between different ethnic populations, the genetic variations, particularly polymorphisms having the potential to modulate the mechanism of action of pharmacotherapy, were put forward as culprits of this variability in response to medications. Furthermore, some researchers have also suggested that certain polymorphisms might be considered as risk factors predisposing towards heart failure or capable of modulating its progression, whether they act as aggravating or attenuation factors. With such hypothesis, many genetic associations were studied, many starting with genes directly implicated in the pathogenesis of this disease. Within the framework of this thesis, we will review the current data available in the literature as it pertains to the influence that various polymorphisms can have on the predisposition, the progression and the pharmacogenetics of heart failure.

Keywords: heart failure, genetic polymorphism, carvedilol, β -blocker, renin-angiotensin-aldosterone system

Table de matières

RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	III
RÉSUMÉ ANGLAIS	V
TABLE DE MATIÈRES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
LA DÉDICACE	XV
LES REMERCIEMENTS	XVI
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
1.1 PRÉAMBULE.....	2
1.2 PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE	2
1.3 DÉFINITION	4
1.4 PATHOGÉNÈSE	6
1.5 LA FONCTION RÉNALE EN INSUFFISANCE CARDIAQUE	7
1.6 MÉCANISMES NEUROHORMONAUX	10
1.6.1 ACTIVATION DU SYSTÈME ADRÉNERGIQUE	10
1.6.2 ACTIVATION DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONE	13
1.7 STRESS OXYDATIF.....	15
1.8 INFLAMMATION.....	15
1.9 ARGININE VASOPRESSINE.....	17
1.10 SYSTÈME CONTRE-RÉGULATEUR.....	18
1.10.1 LES PEPTIDES NATRIURÉTIQUES	18
1.10.2 OXYDE NITRIQUE	20
1.10.3 BRADYKININE	21
1.10.4 DÉSENSIBILISATION BÊTA-ADRÉNERGIQUE	21
1.10.5 EFFETS À LONG TERME: REMODELAGE VENTRICULAIRE	22
1.11 À PARTIR DES SIGNES ET SYMPTÔMES VERS LE DIAGNOSTIC	28
1.12 CAUSES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	33
1.13 TRAITEMENT DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	35
1.14 TRAITEMENT NON-PHARMACOLOGIQUE.....	41
1.15 TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE.....	43
1.15.1 LES INHIBITEURS DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE	47
1.15.2 BÊTA-BLOQUEURS	53
1.15.3 BLOQUEURS DES RÉCEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II	56
1.15.4 ANTAGONISTES DE L'ALDOSTÉRONE	58
1.15.5 COMBINAISON DE L'ISOSORBIDE DINITRATE ET DE L'HYDRALAZINE	60
1.15.5 ANTIARYTHMIQUES EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	61

1.16 INSUFFISANCE CARDIAQUE AVEC FONCTION SYSTOLIQUE PRÉSERVÉE.....	64
1.17 L'AVENUE ET LA PLACE DE LA GÉNÉTIQUE EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	65
1.18 LA RACE EXISTE, MAIS ELLE N'A PAS D'IMPORTANCE.....	66
1.19 IMPLICATION DE LA GÉNÉTIQUE EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	68
1.20 POLYMORPHISMES, PHARMACOGÉNÉTIQUE ET PHARMACOGÉNOMIQUE.....	70
1.20.1 L'ÉPIGÉNÉTIQUE	72
1.21 TYPES D'ÉTUDES GÉNÉTIQUES POSSIBLES EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	76
1.22 SITES CANDIDATS PUTATIFS EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	79
1.23 LA GÉNÉTIQUE DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONÉ.....	80
1.23.1 ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE	80
1.23.2 ANGIOTENSINOGENÈ.....	86
1.23.3 AUTRES SITES CANDIDATS AU NIVEAU DU SRAA	87
1.24 LA GÉNÉTIQUE DU SYSTÈME ADRÉNERGIQUE EN INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	92
1.24.1 RÉCEPTEUR BÊTA ₁ -ADRÉNERGIQUE	92
1.24.2 RÉCEPTEUR BÊTA ₂ -ADRÉNERGIQUE	97
1.24.3 RÉCEPTEUR ALPHA _{2C} -ADRÉNERGIQUE	101
2.0 OBJECTIFS DE THÈSE	104
REFERENCES	110
CHAPITRE II.....	134
TEN RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM-RELATED GENE POLYMORPHISMS IN MAXIMALLY TREATED CANADIAN CAUCASIAN PATIENTS WITH HEART FAILURE	134
PRÉAMBULE	136
RÉSUMÉ	137
SUMMARY	139
1. INTRODUCTION	141
2. METHODS	144
3. RESULTS	148
4. DISCUSSION	151
5. CONCLUSION.....	155
TABLE LEGENDS	157
FIGURE LEGENDS.....	163
REFERENCES.....	165
ÉPILOGUE.....	177
CHAPITRE III	178
INCREASED RISK OF MYOCARDIAL INFARCTION ASSOCIATED WITH ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME GENE POLYMORPHISM IS AGE-DEPENDENT.....	178
PRÉAMBULE	180
RÉSUMÉ	181
ABSTRACT	182
1. INTRODUCTION	183
2. METHODS	186
3. RESULTS	189
4. DISCUSSION	191
5. CONCLUSION.....	195
TABLE LEGENDS	197
FIGURE LEGENDS.....	201
REFERENCES.....	203

ÉPILOGUE.....	208
CHAPITRE IV.....	210
TWO ADRENERGIC RECEPTOR POLYMORPHISMS AFFECT THE HEMODYNAMIC RESPONSE TO CARVEDILOL IN STABLE HEART FAILURE PATIENTS.....	210
PRÉAMBULE	212
RÉSUMÉ	213
ABSTRACT	214
1. INTRODUCTION	215
2. METHODS	218
3. RESULTS.....	226
4. DISCUSSION	229
5. CONCLUSION.....	237
TABLE LEGENDS	239
FIGURE LEGENDS.....	246
REFERENCES.....	251
ÉPILOGUE.....	258
CHAPITRE V.....	260
CONCLUSION ET DISCUSSION.....	260
ANNEXE 1.....	269
ENANTIOSELECTIVE QUANTIFICATION OF CARVEDILOL IN HUMAN PLASMA BY HPLC IN HEAVILY MEDICATED HEART FAILURE PATIENTS.....	269
RÉSUMÉ	271
ABSTRACT.....	272
1. INTRODUCTION	273
2. EXPERIMENTAL	275
3. RESULTS AND DISCUSSION	280
4. CONCLUSION.....	286
TABLE LEGENDS	288
FIGURES LEGENDS	294
REFERENCES.....	297
ANNEXE 2.....	299
EFFECTS OF AGTR1 A1166C GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH HEART FAILURE TREATED WITH CANDESARTAN	299
RÉSUMÉ	303
ABSTRACT.....	305
1. INTRODUCTION	307
2. METHODS	309
3. RESULTS	314
4. DISCUSSION	316
5. CONCLUSIONS	320
TABLE LEGENDS	321
REFERENCES.....	326
ANNEXE 3.....	333
ASSOCIATION BETWEEN RENAL FUNCTION AND CYP3A5 GENOTYPE IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS TREATED WITH CALCINEURIN INHIBITORS.	333
RÉSUMÉ	335
ABSTRACT.....	337
1. INTRODUCTION	339
2. METHOD.....	341
3. RESULTS	344
4. DISCUSSION	347

5. CONCLUSIONS	351
TABLE LEGENDS	352
FIGURE LEGENDS	358
REFERENCES	361
ANNEXE 4.....	367
DÉCLARATION DES COAUTEURS	367

Liste des tableaux

Tableau 1: Présentation clinique de l'insuffisance cardiaque

Tableau 2: Causes et facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque

Tableau 3: Classification fonctionnelle selon la "New York Heart Association"

Tableau 4: Médicaments utilisés en insuffisance cardiaque

Tableau 5: Résumé des essais cliniques pertinents pour l'insuffisance cardiaque avec fonction
systolique détériorée

Tableau 6: Résumé des polymorphismes et leurs effets sur les protéines cibles

Liste des figures

Figure 1: Interrelation entre le cœur, les reins et le système nerveux central dans la réponse physiologique à une hypovolémie sanguine.

Figure 2: Quantité relative des récepteurs alpha- et bêta-adrénergiques dans le tissu cardiaque humain sain.

Figure 3: Taux du facteur de nécrose tumorale alpha en fonction de la classe fonctionnelle de la NYHA.

Figure 4: Schéma illustrant la progression vers le remodelage cardiaque.

Figure 5: Organisation cellulaire du muscle cardiaque en fonction de la progression de l'hypertrophie cardiaque.

Figure 6: Système de classification de stades dans le développement de l'insuffisance cardiaque.

Figure 7: Algorithme de traitement de l'insuffisance cardiaque.

Figure 8: Démonstration schématique d'une divergence pharmacothérapeutique à un même produit.

Figure 9: Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE.

Figure 10: Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE chez des patients n'utilisant pas un bêta-bloqueur.

Figure 11: Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE chez des patients traités avec un bêta-bloqueur.

Figure 12: Survie des patients en insuffisance cardiaque selon l'usage d'un bêta-bloqueur et le génotype Ser49Gly.

Figure 13: Effet du polymorphisme Thr164Ile sur la survie sans transplantation des patients en insuffisance cardiaque.

Liste des sigles et des abréviations

α_{1A} -ADR: récepteur α_{1A} -adrénergique ou récepteur α_{1A} -adrénergique

α_{2C} -ADR: récepteur α_{2C} -adrénergique ou récepteur α_{2C} -adrénergique

ACE: gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

ACE2: gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2

ADN: acide désoxyribonucléique

Ang 1-7: angiotensine 1-7

Ang III: angiotensine 2-8

Ang IV: angiotensine 3-8

ARN: acide ribonucléique

AVP: arginine vasopressine

β_1 -ADR: récepteur β_1 -adrénergique ou récepteur β_1 -adrénergique

β_2 -ADR: récepteur β_2 -adrénergique ou récepteur β_2 -adrénergique

BRA: bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II

cGMP: guanosine monophosphate cyclique

ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine

ECA2: enzyme de conversion de l'angiotensine 2

FEVG: fraction d'éjection du ventricule gauche

HDL: lipoprotéine à haute-densité (de l'anglais: high-density lipoprotein)

IC: insuffisance cardiaque

IECA: inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IRAP: aminopeptidase régulée par l'insuline (de l'anglais: insulin-regulated aminopeptidase)

IM: infarctus du myocarde

NE: norépinéphrine

NYHA: New York Heart Association

SRAA: système rénine-angiotensine-aldostérone

La dédicace

Pour Gabriel et David.

Les remerciements

La réalisation de cette thèse est le fruit de longues années de travail et de dévouement, certes, par contre ceux-ci seraient en vain sans l'appui et l'assistance de plusieurs individus que j'ai eu la chance de rencontrer sur ce long chemin. Je ne saurais pas les citer tous, par contre soyez assurés que je reconnais chacun et chacune, à des degrés divers, mais avec une égale bienveillance, qui ont apporté une contribution à sa finalisation. Mes dettes de reconnaissance sont énormes à votre égard.

Je pense particulièrement au professeur Jacques Turgeon, mon directeur de recherche, qui m'a pris sous son aile pour m'apprendre comment voler de moi-même. Je lui dois la confiance qu'il a eu en moi, ainsi que son soutien incroyable pendant toutes ces années. Je le remercie pour son approche humaine sans précédent, pour ses précieux conseils tant scientifiques que personnelles et son sacrifice à mon égard. Il a toujours trouvé le juste équilibre d'une part, entre la liberté qu'il m'a laissée dans la réalisation de mes travaux et d'autre part, la détermination des pistes à suivre et un soutien total et sans faille dans des moments opportuns. Je lui en serai infiniment reconnaissant.

Je remercie également nos collaborateurs principaux, notamment le Dr. Michel White et le Dr. Simon de Denus pour leur aide inestimable ainsi que pour le temps précieux qu'ils ont su m'accorder. Leur bonne humeur, leur joie de vivre, leur professionnalisme, leur connaissance scientifique et médicale et leur encouragement étaient simplement incroyables.

Je remercie tous mes confrères et consœurs de labo, soit: Dr. Pierre Morissette, Dr. Raymond Hreiche, Dr. Véronique Michaud, Dr. Lucie Couture, Andréa Sirhan-Daneau, Jade Huguet et Philippe Colucci pour leur accompagnement sur ce long parcours. Certains sont passés avant et d'autres passeront après, mais tous vous avez emprunté ce même chemin que moi et vous étiez les seuls à comprendre mes joies et mes frustrations qui sont apparues en route. Je vous souhaite la réalisation de tous vos projets, et au plaisir de se revoir.

Je remercie grandement notre coordonateur de laboratoire, François Bélanger. Son approche calme et posée, ses vastes connaissances au niveau de l'approche expérimentale, sa patience, ses conseils et son aide étaient tous sans pair et faisaient de lui un maître dans l'art de la recherche fondamentale. Je lui dois la grande majorité des connaissances dans cette facette de mes études doctorales.

Je remercie également Sylvie Poirier-Larabie et Fleur Gaudette, deux techniciennes de laboratoire, pour leur assistance et savoir-faire. Leurs conseils, leurs trucs, leurs commentaires et leurs recommandations ont grandement contribué à l'avancement de mon projet et à la bonne exécution de mes procédures expérimentales.

Mes hommages vont aussi à Lucette Whittom et Colette Anctil, deux infirmières impliqués dans le déroulement de mon étude clinique à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Merci beaucoup pour votre patience, vos encouragements, votre soutien... bref, votre présence.

À mes amis, Krzysztof P., Violetta, Adam, Platon, Krzysztof D., Kasia, Iwona, Maloud, entre autres... Pour ce que vous avez été, pour ce que vous êtes, pour ce que vous avez donné, sachez que je le reconnais.

Je remercie tout particulièrement ma famille, soit, ma mère Anna, mon père Mirosław et mon frère Hubert, pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien. Ils ont été présents pour écarter les doutes, sans promouvoir de la complaisance; ils ont poussé dans le dos, en toujours tenant une main pour maintenir le cap; ils ont soigné les blessures; ils ont partagé les joies... Merci pour votre amour, votre force, votre fierté, votre confiance, votre appui...merci.

J'ai une pensée très tendre à l'endroit de mon épouse Monika. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire. Alors que tout paraissait gris, tu as su me montrer les couleurs. Merci pour le soleil que tu es, par les temps froids et sombres. Merci pour l'étoile que tu es, pour les chemins tortueux et obscurs. Merci pour la lune que tu es, pour le soutien que tu m'apportes lorsque je tends d'en décrocher une. Merci pour ton support, ton amour, ton encouragement, ta patience et ta compréhension.

Et finalement, une pensée toute spéciale pour mes deux fils, Gabriel et David. Alors qu'ils sont encore trop jeunes pour comprendre, à chaque jour ils me redressent d'une énergie nouvelle et d'un bonheur ahurissant. Merci à vous deux, papa vous aime très fort.

"I like animals, grass, my old notebook,
And I like the smell of the sea, the smell of the sea."

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Préambule

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés. Au-delà de cinq millions de patients en sont atteints en Amérique du nord et à chaque année environ 550 000 individus additionnels en sont diagnostiqués pour la première fois [1]. Étant principalement une condition affectant les personnes âgées, le vieillissement de la population contribue à l'augmentation de son incidence [2]. Annuellement, ce désordre évoque jusqu'à 15 millions de visites médicales et près de 7 millions de jours d'hospitalisation [3]. La mortalité, chiffrée à plus de 300 000 par an, ne cesse d'augmenter, et fait de l'IC la seule condition cardiovasculaire encore en hausse à ce chapitre [1]. Ce nombre de décès en hausse pourrait être expliqué par les avancements thérapeutiques récents et par une meilleure prise en charge des conditions pouvant mener directement vers l'IC, comme l'infarctus du myocarde (IM).

1.2 Physiologie du système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est en fait, lorsque considéré dans son état le plus simpliste, une pompe connectée à des tuyaux qui propulse un liquide. Dans ce contexte, la pompe est le cœur, le liquide est le sang et les tuyaux sont les veines et les artères. Une caractéristique particulière de ce système est qu'il est en fait composé de deux sous-systèmes, la circulation pulmonaire et la circulation corporelle, avec le cœur dans un réseau à double compartiments comme point central. On peut donc sous-tendre que ce dernier n'est pas juste une pompe, mais

deux pompes travaillant simultanément. Le côté droit du cœur envoie le sang vers les poumons pour que celui-ci s'oxygène, se purifie du gaz carbonique et retombe dans le côté gauche du cœur. À son tour, le côté gauche envoie le sang vers la circulation systémique qui alimente l'ensemble de l'organisme avec un sang bien oxygéné et qui retourne du côté droit pour recommencer ce cycle. La deuxième particularité de ce système implique une certaine autosubsistance, puisqu'une petite fraction de la circulation corporelle est dédiée à alimenter la pompe elle-même. Alors qu'on ne peut nier de l'ingéniosité d'une telle conception, cela représente aussi le talon d'Achille de ce système; lorsque le cœur commence à éprouver de la difficulté à pomper, il coupe sa propre alimentation, ce qui le propulse vers une spirale vertueuse destructive. Et la troisième caractéristique particulière de ce système est qu'il est en circuit fermé; les reins étant le seul point d'ouverture. Il n'y a donc pas de fuites, pas de pertes et pas de gaspillage. Alors que cette particularité rend ce système très efficace, cela devient aussi une des causes de certains problèmes et de maladies.

Comme ce système est en circuit, le cœur et tous ses constituants nécessitent des mécanismes qui leur permettent d'être malléables afin qu'ils puissent s'ajuster et réagir convenablement à toutes sortes de changements encourus. En effet, des changements de volume ou de pression doivent initialement être gérés à l'interne en jouant sur les divers constituants du système lui-même. Par conséquent, la fréquence et la force de contraction du cœur, ainsi que le rétrécissement ou le relâchement des artères et des veines, permettent à ce système de s'adapter rapidement aux diverses conditions constamment changeantes chez un être vivant. Cependant, comme toute chose à ses limites, le système cardiovasculaire lui aussi ne peut compenser que jusqu'à un certain point. Il y a donc un point limite où une pompe ne peut pas pomper à vide;

pareillement il y a un point supérieur où une pompe est surchargée. L'IC est une de ces conditions où, suite à une panoplie d'effets et de contre-effets, le système est surchargé et le cœur en souffre.

1.3 Définition

Au cours des années, plusieurs définitions apparurent pour décrire le syndrome clinique de l'IC. Concomitamment, divers modèles ont été proposés pour décrire et comprendre ce syndrome. Initialement, l'IC était perçue comme un problème de rétention excessive d'eau et de sel causée par une anomalie au niveau du débit sanguin rénal. Ce modèle fût connu sous le nom du "modèle cardio-rénal" [4]. Cependant, suite à des prises des mesures hémodynamiques, il est devenu apparent que l'IC était aussi reliée à un débit cardiaque réduit. Un deuxième modèle fût donc proposé, qui devint le "modèle hémodynamique" [4]. Ce dernier liait l'IC à une anomalie du cœur à pomper convenablement, ainsi qu'à une vasoconstriction périphérique excessive. Cependant, même si ces deux modèles d'IC pouvaient expliquer la rétention excessive de sel et d'eau que les patients éprouvent, aucun ne pouvait expliquer l'incessante progression de la maladie. En effet, quoique le modèle cardio-rénal procurait une rationale pour l'utilisation de diurétiques dans le contrôle volumique des patients atteints d'IC, et le modèle hémodynamique procurait une rationale pour l'utilisation des inotroques positifs et des vasodilatateurs pour augmenter le débit cardiaque, ces stratégies se sont avérées inefficaces pour contrôler la progression de la maladie ou pour prolonger la survie des patients avec l'IC.

Présentement, dans le cadre de la pratique courante ainsi que dans le milieu de la recherche clinique, plusieurs termes sont fréquemment utilisés dans le contexte d'IC qui décrivent

ou catégorisent un type particulier d'IC ou de pathologie sous-jacente, soit: IC gauche, IC droite, IC en amont, IC en aval, IC systolique, IC diastolique, IC à haut débit, IC à faible débit, cardiomyopathie restrictive et cardiomyopathie dilatée. Également, durant une période très longue, l'IC était connue sous le terme d'IC congestive. Cependant, l'épithète "congestive" fût abandonné au dépend de l'appellation courante, celle d'IC tout court, puisque des patients peuvent être atteints de cette maladie sans nécessairement exhiber une surcharge liquidienne. Donc, à l'encontre de ces qualifications limitatives, l'IC se définit globalement comme étant un syndrome complexe dans lequel un fonctionnement anormal du cœur résulte ou augmente le risque subséquent de signes et symptômes cliniques d'un débit cardiaque inadéquat. Ce dernier peut parfois être accompagné d'une congestion pulmonaire ou systémique. Cette anomalie au niveau du cœur, pouvant être d'ordre structural ou fonctionnel, diminue la capacité du cœur de maintenir sa fonction usuelle, soit celle d'une pompe qui supporte la circulation physiologique et est soumise à des changements dans les réponses hémodynamiques, rénales, neuronales et hormonales.

Il est donc devenu clair que l'IC ne relevait pas simplement des paramètres rénaux ou hémodynamiques. En conséquence, nous aborderons l'IC sous son aspect plus large, en incorporant des composantes moléculaires et cellulaires, avec une emphase particulière sur le rôle de l'activation neurohormonale du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et du système adrénergique.

1.4 Pathogénèse

L'IC est un désordre cardiaque qui s'amorce après un événement déclencheur: soit un dommage au muscle cardiaque avec comme résultante une perte de cardiomyocytes fonctionnels, soit une perturbation dans l'habilité du myocarde à générer de la force avec comme résultante un cœur incapable de se contracter convenablement ou soit une entrave dans le processus de relaxation myocardique qui empêche le remplissage sanguin des ventricules. Cet événement déclencheur peut avoir un début abrupt, tel que dans le cas d'IM ou un début graduel et insidieux, tel que dans le cas de l'hypertension. Indépendamment de la nature de l'événement déclencheur, ce qui est commun, c'est que tous provoquent un déclin graduel dans la capacité du cœur à pomper le sang et ce même en l'absence d'une autre offense subséquente. Ce phénomène déclenche un cycle délétère dans lequel le myocarde subit des changements métaboliques et morphologiques conduisant à son hypertrophie parsemée de fibrose [5]. Ces changements cellulaires altèrent graduellement les propriétés structurelles des ventricules par un processus appelé le remodelage cardiaque. Quoique le remodelage survient comme une réponse adaptative afin de corriger la performance cardiaque, à la longue, cette réponse devient contreproductive et mal adaptative [5]. Les changements au niveau de la taille et de la forme des chambres ventriculaires affaiblissent la performance mécanique cardiaque et altèrent l'étanchéité des valves cardiaques; des phénomènes qui ne font qu'aggraver la situation en maintenant et exacerbant le processus de remodelage. Généralement, ce dernier précède le développement de symptômes, continue après leur apparition et contribue substantiellement à leur nature aggravante. L'activation du système endogène neurohormonal joue un rôle prééminent dans le remodelage cardiaque et conséquemment à la progression de l'IC. Les patients atteints de cette condition

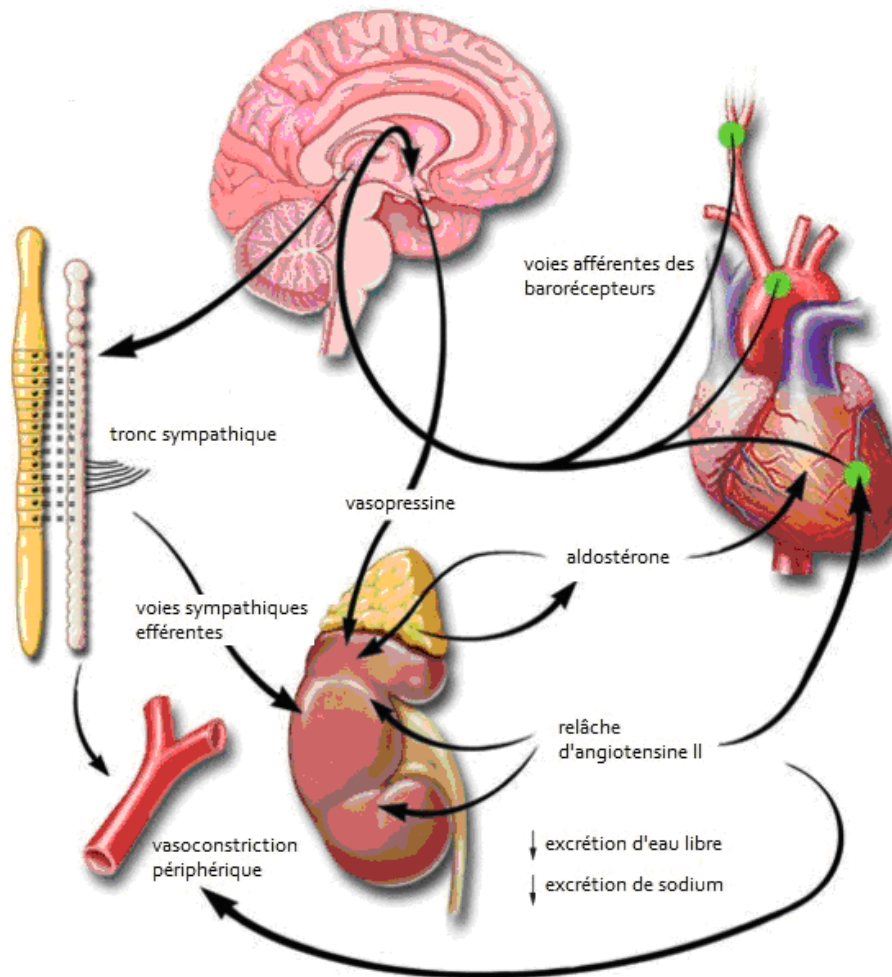
présentent des taux circulants et tissulaires élevés de norépinéphrine (NE), d'angiotensine II, d'aldostérone, d'endothéline et de vasopressine, entre autres, qui peuvent tous, directement ou indirectement, seuls ou de concert, affecter défavorablement la structure et/ou la fonction du cœur. En plus de leur effet sur la rétention sodique et liquidienne et de leur effet vasoconstricteur qui imposent un stress hémodynamique additionnel sur le cœur, ces facteurs neurohormonaux semblent aussi avoir un effet toxique cardiaque direct qui transforme l'architecture du cœur. Ceci contribue davantage à la diminution de sa performance.

1.5 La fonction rénale en insuffisance cardiaque

En IC, la fonction rénale est fortement liée à la fonction cardiaque. En fait, dans les stades avancés de la maladie, il n'est pas surprenant de voir ces deux organes défaillir simultanément. Il devient alors impossible de prédire quel organe est responsable de la dégradation de l'autre; l'insuffisance rénale proviendrait d'une perfusion sanguine inadéquate due à un débit cardiaque affaibli ou l'IC découlerait d'une surcharge volumique augmentée suite à la rétention de sel et d'eau par les reins. Peu importe le mécanisme sous-jacent, la résultante est une transsudation de sel et d'eau à partir du compartiment intravasculaire vers l'espace extracellulaire et la formation d'œdème, un signe caractéristique de l'IC. Ainsi, même si la quantité d'eau corporelle est grandement augmentée, le débit cardiaque insuffisant projette l'apparence d'un volume d'eau artériel faible, ce qui active les systèmes compensatoires à adapter une réponse systémique afin de combattre la perception d'une perte de sang. Cette perte de volume sanguin artériel "effectif" est sentie par des barorécepteurs dans le ventricule gauche, l'arche de l'aorte, le sinus carotidien et les artérioles rénales afférentes. Subséquemment, la perte du signal inhibiteur provenant de ces

barorécepteurs conduit à une activation soutenue du système nerveux sympathique et du SRAA (figure 1).

Figure 1: Interrelation entre le cœur, les reins et le système nerveux central dans la réponse physiologique à une hypovolémie sanguine.



L'activation des barorécepteurs (cercles verts) dans le ventricule gauche, le sinus carotidien, et l'arche aortique génère des signaux afférents qui stimulent des centres cardio-régulateurs dans le cerveau. Ceci entraîne l'activation des voies efférentes du système nerveux sympathique. L'activation des nerfs sympathiques rénaux stimule la libération d'arginine vasopressine. L'activation sympathique, de pair avec l'angiotensine II, provoque également une vasoconstriction périphérique et rénale. L'angiotensine II stimule la libération d'aldostérone par la glande surrénale, augmente la réabsorption du sodium par les reins et contribue au remodelage des myocytes cardiaques. En plus d'augmenter la réabsorption du sodium et d'eau et la sécrétion de potassium dans le canal collecteur, l'aldostérone semble aussi avoir des effets directs cardiaques (ex. fibrose, hypertrophie, inflammation, etc.). (Adapté de [6])

1.6 Mécanismes neurohormonaux

Tel que mentionné précédemment, suite à une perturbation du bon fonctionnement cardiaque secondaire à un événement déclencheur, un nombre de mécanismes compensatoires sont enclenchés pour permettre de rétablir un débit cardiaque adéquat et de rétablir la capacité fonctionnelle du patient. Les deux principaux mécanismes compensatoires sont le système adrénergique et le SRAA. Ceux-ci sont responsables du maintien du débit cardiaque par l'augmentation de la rétention de sodium et d'eau, la vasoconstriction artérielle périphérique et une augmentation de la contractilité cardiaque. Néanmoins, l'activation persistante de ces mécanismes contribue à la progression de la maladie en vertu de leur caractère délétère sur le cœur, le rein et la circulation.

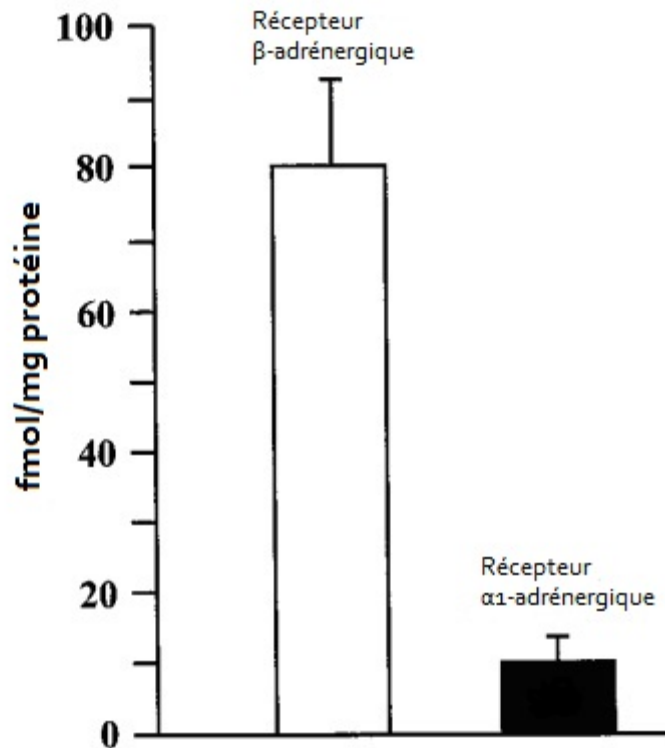
1.6.1 Activation du système adrénergique

La diminution du débit cardiaque dans le contexte de l'IC active rapidement le système adrénergique [7]. Cette activation est accompagnée d'une façon concomitante par le retrait du tonus parasympathique. Chez des individus en santé, le signal afférent inhibiteur des barorécepteurs artériels et cardiopulmonaires est le principal responsable du tonus sympathique. Le contrôle parasympathique de la fréquence cardiaque est aussi sous le contrôle du baroréflexe artériel. Puisqu'il n'y a pas de signal évoquant une baisse du débit cardiaque ou d'hypotension chez un sujet sain, la décharge sympathique efférente et la concentration des catécholamines artérielles est faible, la décharge sympathique au repos est basse et la variabilité de la fréquence cardiaque élevée. À l'opposé, chez des patients en IC, le réflexe inhibiteur des barorécepteurs et

des mécanorécepteurs artériels s'abaisse et le réflexe excitateur augmente. Ceci résulte en une augmentation du stimulus sympathique et une atténuation du système parasympathique. Conséquemment surviennent une perte du contrôle de la variabilité cardiaque par le système parasympathique et une résistance périphérique vasculaire augmentée. De plus, suite à l'augmentation du tonus sympathique, les taux circulants plasmatiques de NE, un puissant neurotransmetteur adrénergique, augmentent [8]. Cette augmentation proviendrait de la surcharge et du débordement synaptique, menant vers une réduction de la recapture de cette molécule par les terminaisons nerveuses efférentes, avec comme conséquence, sa fuite vers le plasma. Ces taux plasmatiques peuvent atteindre le double ou le triple des valeurs normales chez certains patients en IC avancée [9].

Pour répondre au stimulus adrénergique, le cœur humain est doté de principalement trois sortes de récepteurs post-synaptiques, soit le récepteur α_{1A} -adrénergique (α_{1A} -ADR) [10], le récepteur β_1 -adrénergique (β_1 -ADR) [11] et le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 -ADR) [11]. Cependant, la densité des récepteurs β est grandement supérieure à celle des α , de sorte que dans l'organe sain, ces derniers ne représentent qu'au plus 15% de la population des récepteurs adrénergiques (figure 2). Par conséquent, le tonus sympathique s'exprime principalement par les récepteurs β [12, 13], ce qui attribue aux récepteurs α une pertinence physiologique cardiaque limitée. Par contre, la contribution des α_{1A} -ADR à l'effet inotrope de la NE devient non négligeable en IC suite à la désensibilisation des récepteurs β (voir section 1.10.4).

Figure 2: Quantité relative des récepteurs alpha- et bêta-adrénergiques dans le tissu cardiaque humain sain.



Quantités des récepteurs β - et α_1 -adrénergiques ventriculaires dans un cœur humain sain. À gauche, nombre de récepteurs β -adrénergiques et à droite, nombre de récepteurs α_1 -adrénergiques (en fmol/mg de protéines totales). (Adapté de [14])

Donc, dans le cœur sain, et du moins dans les stades précoces de l'IC, le tonus sympathique s'exprime surtout par les récepteurs β_1 -ADR et β_2 -ADR. Encore une fois, les proportions de ces deux récepteurs ne sont pas égales dans le cœur humain, de sorte que le ratio β_1 -ADR/ β_2 -ADR est de l'ordre de 70-80%:30-20% [15]. Néanmoins, la réponse fonctionnelle passant par ces deux récepteurs est sensiblement la même, soit une augmentation de la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif) et une augmentation de la force de contraction du cœur (effet inotrope positif) [14].

Ceci a comme conséquence une élévation du débit cardiaque, compensant ainsi la baisse initiée par l'IC. De plus, le déversement plasmatique de la NE active les récepteurs adrénergiques α de type 1_A en périphérie et provoque une vasoconstriction artérielle systémique, ce qui aide à maintenir la pression sanguine. Au niveau des reins, la vasoconstriction diminue le débit sanguin rénal avec comme conséquence une augmentation de la réabsorption de sodium et d'eau par les néphrons. Ce type de support de la circulation par le système adrénergique procure, à court terme, un rétablissement des fonctions vitales à la normale. Par contre, si ce système est continuellement surexploité, des conséquences délétères surviendront à long terme [16].

1.6.2 Activation du système rénine-angiotensine-aldostérone

À l'encontre du système adrénergique, le SRAA est activé plus tardivement en IC. La baisse du débit cardiaque engendre une hypoperfusion rénale, ce qui provoque une diminution du sodium filtrée atteignant la *macula densa* des tubules distales et l'augmentation subséquente de la production et du relâchement de la rénine. Parallèlement, la stimulation directe des reins par le système adrénergique provoque elle aussi une libération de la rénine par l'appareil juxtaglomérulaire. La rénine pourra ensuite cliver l'angiotensinogène pour former l'angiotensine I. Cette dernière sera à son tour clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour former une entité biologiquement active, l'angiotensine II. Bien que l'angiotensine II puisse être formée par des mécanismes indépendants de la rénine et de l'ECA, cette voie métabolique joue un rôle capital dans la progression et le pronostic de l'IC, tel que démontré par plusieurs études cliniques.

L'effet pharmacologique de l'angiotensine II s'effectue par une activation des récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT₁) et type 2 (AT₂). L'activation de l'AT₁ entraîne la vasoconstriction, la croissance cellulaire, la sécrétion d'aldostérone et une relâche de catécholamines, tandis que l'activation de l'AT₂ provoque la vasodilatation, l'inhibition de la croissance cellulaire et la natriurèse. En IC, les niveaux de l'AT₁ sont abaissés, alors que ceux de l'AT₂ sont augmentés ou du moins inchangés. Des taux augmentés d'angiotensine II ont été par ailleurs associés avec un pire pronostic et une hausse de mortalité chez les patients en IC [17].

Comme c'est le cas pour le système adrénergique et la NE, le SRAA et l'angiotensine II procurent des effets indispensables pour maintenir l'homéostasie de la circulation à court terme. Cependant, à long terme, la stimulation soutenue et prolongée de ce système devient nocive et mène vers la fibrose cardiaque et rénale. L'effet nocif de l'angiotensine II passe aussi par son effet sur la relâche de la NE et par une stimulation de la production et la sécrétion d'aldostérone. Cette dernière, à l'exemple de l'angiotensine II, procure aussi un support à la circulation en incitant la réabsorption de sodium et d'eau. Similairement, à long terme, l'aldostérone exerce des contrecoûts nuisibles; elle induit une hypertrophie et une fibrose vasculaire et myocardique. De plus, l'aldostérone engendre une dysfonction endothéliale, une dysfonction des barorécepteurs et inhibe la recapture de la NE, tous des effets aggravants en IC qui empirent le pronostic et la progression de cette maladie.

1.7 Stress oxydatif

Le stress oxydatif survient lorsque la production des espèces réactives de l'oxygène dépasse la capacité tampon du système antioxydant endogène. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent alors moduler l'activité de plusieurs protéines et voies de signalisation intracellulaires, ce qui résulte en une dysfonction et, souvent, une mort cellulaire. Le stress oxydatif est augmenté chez les patients atteints d'IC [18]. Celui-ci contribue alors à la dysfonction contractile du myocarde et, entre autres, stimule l'hypertrophie des myocytes, altère l'activité et l'expression de canaux (ex. canaux calciques de type L, canaux calciques RyR2 du réticulum sarcoplasmique) et transporteurs ioniques (ex. Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, échangeur Na^+ - Ca^{2+} sarcolemmal) et provoque l'apoptose [19, 20]. Le stress oxydatif est aussi impliqué dans l'induction de certaines cytokines et de l'inflammation.

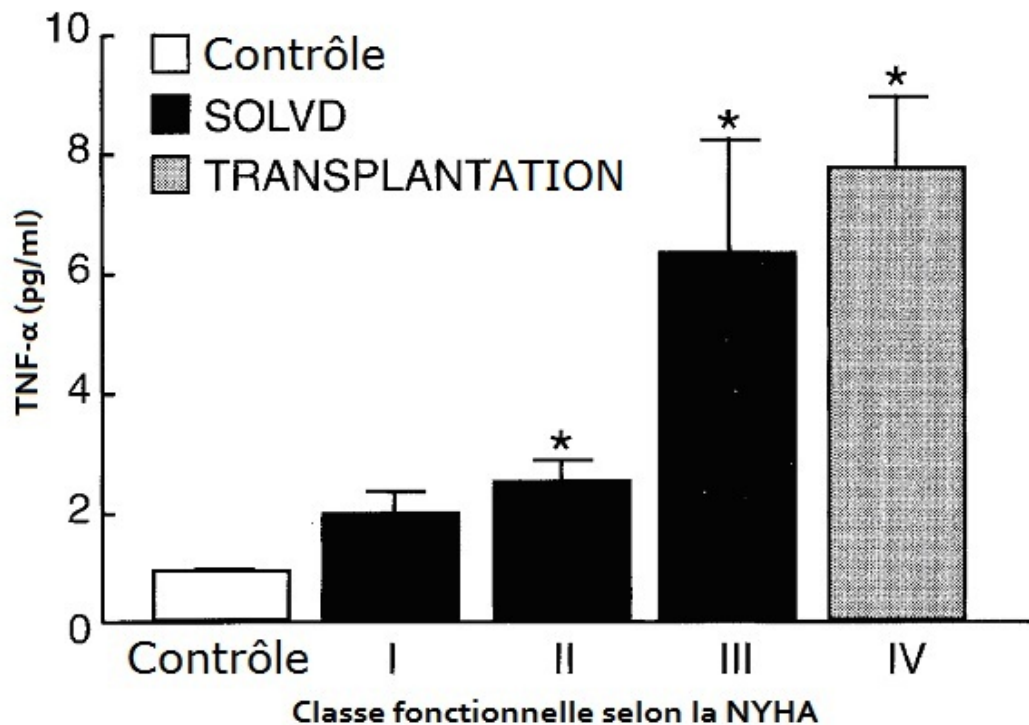
1.8 Inflammation

Les avancées scientifiques démontrent l'implication de l'inflammation dans l'IC [19, 21]. Son rôle physiologique primaire serait alors de moduler la réparation tissulaire suite à une lésion myocardique. Cependant, par son action chronique, l'inflammation pourrait contribuer au remodelage cardiaque indésirable vu en IC [22].

Plusieurs rapports ont confirmé que les patients en IC ont des taux élevés du facteur de nécrose tumorale α (de l'anglais: tumor necrosis factor α) (TNF- α), une cytokine impliquée dans

l'inflammation systémique [21]. Cette molécule, lorsque exprimée à des taux suffisamment hauts, peut expliquer plusieurs aspects observés en IC: une dysfonction du ventricule gauche, un œdème pulmonaire et un remodelage ventriculaire. De plus, une augmentation progressive des taux circulants du TNF- α est en relation directe avec la classe fonctionnelle NYHA des patients en IC [23] (figure 3).

Figure 3: Taux du facteur de nécrose tumorale alpha en fonction de la classe fonctionnelle de la "New York Heart Association".



Taux du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) chez des individus sains et des patients en insuffisance cardiaque de classe I à IV selon la New York Heart Association (NYHA). En comparaison avec des sujets contrôles appariés pour l'âge (rectangle blanc), les taux du TNF- α augmentaient progressivement au fur et à mesure que la classe fonctionnelle de la NYHA diminuait. Les rectangles solides dénotent des valeurs pour des patients prenant part à l'étude SOLVD [24]; le rectangle gris dénote des valeurs pour des patients en classe IV subissant une transplantation cardiaque [25]. * $p < 0.05$ versus groupe contrôle. (Adapté de [21])

Cependant, les mécanismes exacts de cette augmentation ne sont pas clairs et le TNF- α pourrait aussi bien être juste un marqueur de la sévérité de la maladie. L'interleukine-6 est une autre cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la réponse immune et inflammatoire. Comme dans le cas du TNF- α , des taux élevés d'interleukine-6 ont été remarqués chez des patients en IC [23]. Ces taux étaient aussi progressivement en hausse en fonction de la classe fonctionnelle des patients. De plus, similairement au TNF- α et aux autres intermédiaires d'inflammation, les taux d'interleukine semblent être associés avec le pronostic des individus affectés par cette condition [26].

À l'inverse, les niveaux de molécules anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 sont relativement réduits, ce qui suggère que le déséquilibre entre les molécules anti-inflammatoires et pro-inflammatoires pourrait contribuer à la progression de l'IC [27].

1.9 Arginine vasopressine

L'arginine vasopressine (AVP) est une hormone relâchée par la glande pituitaire postérieure qui joue un rôle primordial dans le contrôle de l'osmolalité plasmatique par sa régulation de la clairance d'eau pure [28]. Cette hormone est habituellement sécrétée en réponse à une hausse de l'osmolalité plasmatique, provoquant une rétention d'eau par les reins. Au niveau vasculaire, l'AVP serait un vasoconstricteur. Des taux augmentés d'AVP circulante ont été remarqués en IC; ce phénomène pourrait contribuer à la hausse de la résistance vasculaire systémique et à l'équilibre d'eau corporel positif vus en IC [29]. Ces effets de l'AVP passent par

deux types de récepteurs: le V_{1a} et le V_2 . Le premier serait impliqué dans la vasoconstriction et le deuxième module l'effet antidiurétique de l'AVP en stimulant l'insertion d'aquaporines au niveau du tube collecteur du néphron [28]. Même si des agents bloquant ces récepteurs existent, leur utilisation chez des patients en IC ne s'est pas révélée bénéfique sur le pronostic de cette maladie [30, 31].

1.10 Système contre-régulateur

Un certain nombre de systèmes neurohormonaux deviennent activés afin de contrebalancer les effets inotropiques, vasoconstricteurs et antidiurétiques des systèmes décrits précédemment. Parmi ceux-ci, le plus important est le système des peptides natriurétiques.

1.10.1 Les peptides natriurétiques

Alors que cinq molécules structurellement reliées font partie de la famille des peptides natriurétiques, deux d'entre elles sont particulièrement intéressantes dans le contexte de l'IC. Ces peptides possèdent des propriétés natriurétiques, diurétiques et vasodilatatrices et sont impliqués dans l'homéostasie du volume liquidien corporel et du contrôle de la pression sanguine.

Le peptide natriurétique auriculaire, l'ANP (de l'anglais: atrial natriuretic peptide), est aussi connu sous le nom de facteur natriurétique auriculaire (ANF, de l'anglais: atrial natriuretic factor), l'hormone natriurétique auriculaire (ANH, de l'anglais: atrial natriuretic hormone) ou

l'atriopeptine. Ce peptide de 28 acides aminés est sécrété principalement par les cardiomyocytes des oreillettes suite à un étirement des chambres atriales, répondant souvent à un stimulus comme l'hypervolémie. C'est un vasodilatateur puissant causant une natriurèse importante.

Le peptide cérébral natriurétique, le BNP (de l'anglais: brain natriuretic peptide), est aussi connu sous le nom du peptide natriurétique de type B. Même si son appellation découle de sa découverte initiale dans des extraits cérébraux porcins, chez l'humain il provient principalement du tissu cardiaque. Ce polypeptide de 32 acides aminés est co-sécrété avec son fragment N-terminal de 76 acides aminés, le NT-proBNP, à partir des ventricules cardiaques suite à un étirement des cardiomyocytes. Son action physiologique est alors de réduire la résistance vasculaire systémique et la pression veineuse centrale, puis d'augmenter la natriurèse. Son effet sur la réduction du volume sanguin réduit la composante congestive de l'IC et procure un désengorgement veineux. Par contre, de par son action sur la résistance vasculaire, une baisse trop importante aurait un effet non souhaitable puisqu'elle serait accompagnée d'une baisse du débit cardiaque.

Le BNP et le NT-proBNP sont actuellement des outils de dépistage et de diagnostic de l'IC, surtout lors de sa présentation aigüe. De plus, ils peuvent être utiles dans l'établissement de pronostic, car les taux de ces deux marqueurs semblent être typiquement plus élevés chez des patients avec un état pathologique sévère [32]. Les concentrations plasmatiques de ces deux marqueurs sont plus élevées chez des patients avec une dysfonction ventriculaire gauche. De plus, la hausse des taux de ces marqueurs a été associée à la réduction de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) [33]. Par contre, il n'y a pas de niveau plasmatique qui délimite et sépare de façon caractéristique ceux avec l'IC, de ceux sans l'IC. En fait, pour le NT-proBNP, il

existe une zone grise, se situant entre 100 et 500 pg/ml, pour laquelle le test plasmatique est considéré ininterprétable. De ce fait, des concentrations au-dessus de 500 pg/ml sont considérés comme positifs et ceux en-dessous de 100, négatifs. Puisqu'un diagnostic d'IC engendre un processus thérapeutique important, certains auteurs considèrent alors un taux inférieur à 50 pg/ml comme négatif. Une attention particulière doit être portée aux certaines conditions pouvant influencer les taux plasmatiques du NT-proBNP. C'est le cas de la fonction rénale, de l'âge, du sexe et du poids du patient [34]. De plus, des taux élevés sont aussi associés à certains désordres pathologiques comme une embolie pulmonaire ou une maladie pulmonaire obstructive chronique. Par conséquence, même si des taux élevés sont en accord avec un diagnostic d'IC, ou du moins en déclenchent sa considération, ils ne devraient jamais être utilisés seuls pour confirmer ou exclure la présence d'IC.

Vu ces effets hémodynamiques, diurétiques et natriurétiques avantageux en IC, des molécules simulant les peptides natriurétiques (ex. nésiritide) furent développées. Ces agents ont aussi des propriétés vasodilatatrices qui stimulent indirectement l'augmentation du débit cardiaque et inhibent l'activation neurohormonale. Le nésiritide est présentement utilisés en IC aigüe [35]. Cependant, son effet sur la morbidité et la mortalité à long terme n'est pas encore connu et il est actuellement sous investigation comme traitement adjuvant pour l'IC avancée [36].

1.10.2 Oxyde nitrique

Des taux élevées d'oxyde nitrique ont été remarqués en IC [37]. L'oxyde nitrique est une molécule importante permettant de contrecarrer une vasoconstriction périphérique, d'où son rôle

probable dans la pathophysiologie de l'IC. De plus, cette molécule atténuerait la toxicité myocardique engendrée par le système adrénergique [38]. C'est un gaz produit par l'enzyme oxide nitrique synthétase (de l'anglais: nitric oxide synthase). L'oxyde nitrique active la guanylate cyclase, qui produit de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), qui à son tour active une cascade de messagers secondaires menant à une vasodilatation suite à la relaxation des muscles lisses vasculaires.

1.10.3 Bradykinine

La bradykinine est un vasodilatateur provenant d'un précurseur protéique inactif. L'effet cardiovasculaire principal de la bradykinine provient de sa liaison au récepteur B₂ de la bradykinine. La stimulation de ce récepteur active la synthase d'oxide nitrique, ce qui mène à une vasodilatation. En effet, la dégradation de la bradykinine est catalysée par l'ECA. Ainsi, cette dernière ne mène pas seulement à la formation d'un vasoconstricteur puissant (angiotensine II), mais aussi à la destruction d'un agent promouvant la vasodilatation. D'ailleurs, cette double fonction pourrait expliquer la grande efficacité des inhibiteurs de l'ECA en IC.

1.10.4 Désensibilisation bêta-adrénergique

La stimulation incessante du tonus sympathique cause une régulation à la baisse des récepteurs β -adrénergiques qui est reflétée par une diminution de leur densité cardiaque [15]. Conséquemment, la réponse contractile à des mêmes niveaux d'agonistes de ces récepteurs

diminue. Chez des patients en IC, cette réduction en densité implique primordialement le β_1 -ADR [39]. Curieusement, les niveaux de β_2 -ADR semblent inchangés, ou du moins diminués légèrement, de sorte que le ratio β_1 -ADR/ β_2 -ADR chute [40]. Cette régulation à la baisse des β_1 -ADRs augmente l'importance et la contribution des β_2 -ADRs à l'isotropie cardiaque. Par contre, certains mécanismes intracellulaires augmentent le découplage de ces récepteurs de leur système de second messenger intracellulaire [41]. L'effet net est donc une désensibilisation β -adrénergique, ce qui est à la fois bénéfique et délétère en IC. En diminuant la contraction cardiaque et le débit sanguin, la désensibilisation est délétère; cependant, en protégeant les myocytes des effets néfastes d'une stimulation adrénergique perpétuelle, celle-ci peut être favorable. Ces notions seront revues plus tard puisqu'elles sont la base du traitement avec des β -bloqueurs en IC.

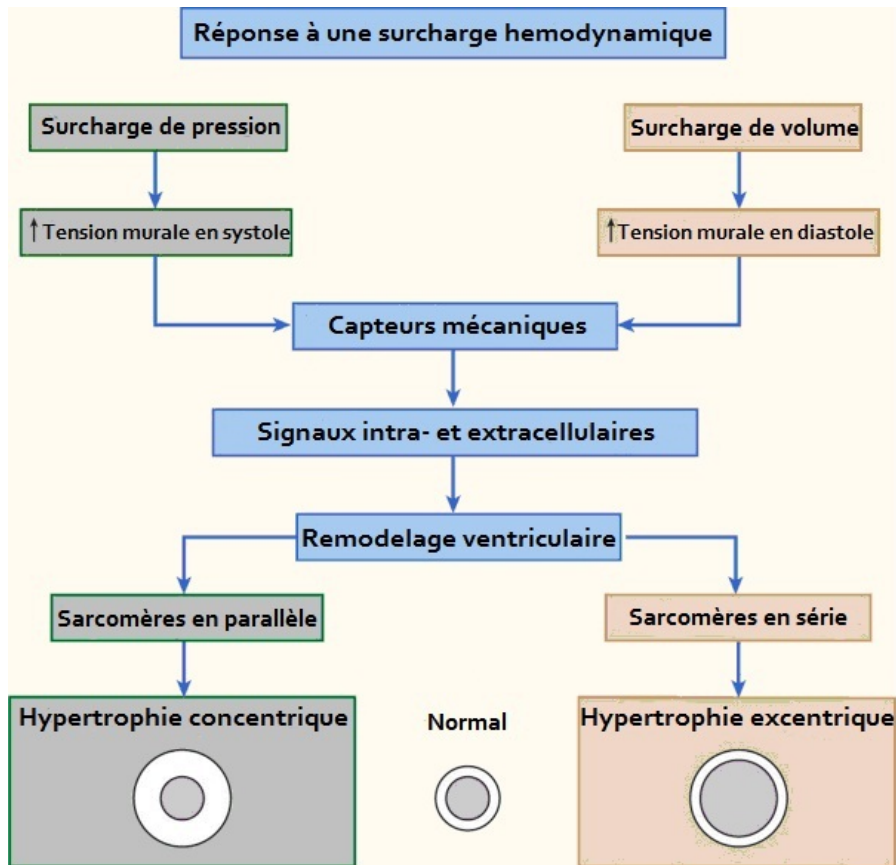
Par ailleurs, la désensibilisation associée aux récepteurs β ne semble pas avoir lieu au niveau des α_{1A} -ADRs [42]. Conséquemment, leur densité relative augmente, ce qui, du moins théoriquement, leur confère une importance physiologique plus grande. Cependant, les données actuelles indiquent que le couplage de ce récepteur au système effecteur soit défectueux en IC, ce qui réfute l'hypothèse que l' α_{1A} -ADR seraient importants dans la préservation d'une activité inotrope du cœur suite à la désensibilisation des récepteurs β [14].

1.10.5 Effets à long terme: remodelage ventriculaire

La surexploitation et stimulation incessante des systèmes compensatoires pour rétablir la diminution progressive du débit cardiaque ne peut cependant maintenir un statu quo hémodynamique à long terme. Ceci se produit puisque ces systèmes forcent le cœur à travailler

encore plus fort en dépit de sa dégénérescence. On fait souvent référence à cet état en le comparant au fouettage excessif d'un cheval déjà fatigué; si rien ne change, le cheval va finir par tomber et mourir. Ainsi, pour se protéger d'un tel scénario, le cœur se transforme et change. Ceci est communément appelé le remodelage.

Figure 4: Schéma illustrant la progression vers le remodelage cardiaque.

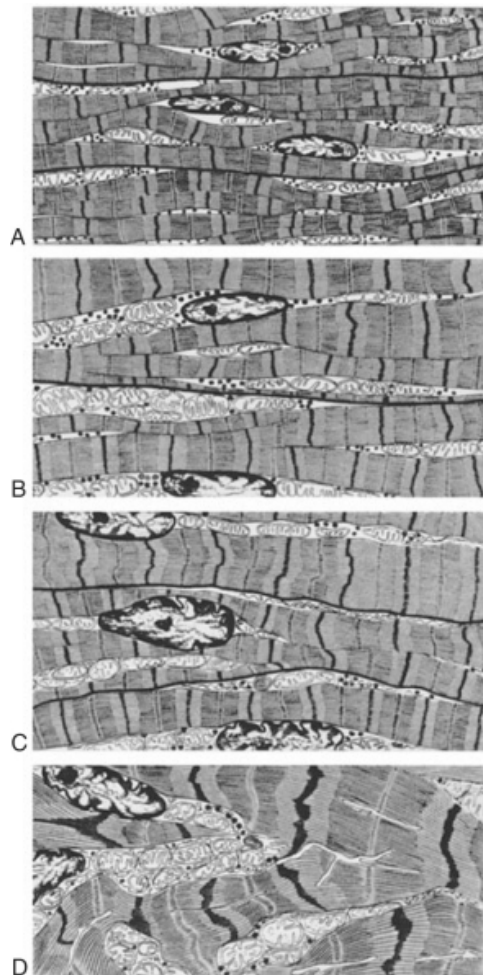


La nature de surcharge hémodynamique dicte le motif du remodelage cardiaque. Lorsque la surcharge est principalement due à une augmentation de pression (ex. hypertension systémique, sténose aortique), l'élévation de la tension murale en systole mène à une addition de sarcomères en parallèle et à un élargissement des myocytes, ce qui résulte en une hypertrophie cardiaque concentrique. Lorsque la surcharge est principalement due à une augmentation de volume (ex. régurgitation valvulaire), l'accroissement de la tension murale en diastole induit une addition de sarcomères en série et un allongement des myocytes, ce qui résulte en une dilatation ventriculaire et une hypertrophie excentrique. (Adapté de [43])

Deux types de remodelage sont couramment reconnus en IC, soit une hypertrophie concentrique ou excentrique (dilatée) (figure 4). Le premier type survient surtout dans les cas de surcharge de pression, tel que l'hypertension artérielle. Afin de répondre aux demandes accrues des efforts qui lui sont exigés, un épaissement mural du ventricule gauche se produit et le cœur grossit. À l'opposé, le deuxième type survient dans les cas de surcharge volumique, comme dans le cas d'une régurgitation valvulaire. Dans ce contexte, le volume sanguin excessif cause une surcharge en diastole et force le cœur vers une dilatation ventriculaire. Quoique morphologiquement différents, les étapes initiales de ces types de remodelage se ressemblent et sont caractérisées par une hypertrophie des myocytes. Au fur et à mesure que l'hypertrophie progresse, les cellules perdent progressivement leur organisation structurale interne (figure 5). Comme résultante, les structures contractiles des myocytes deviennent perturbées et le système en entier devient encore plus inapte à pomper le sang.

Il est reconnu que les myocytes sont des cellules ayant atteint la différenciation terminale. Par conséquent, il est généralement supposé que le remodelage cardiaque consiste principalement dans la croissance des myocytes individuels. Toutefois, il a été récemment suggéré que la prolifération des myocytes (hyperplasie), possiblement via un processus de division non-mitotique, peut également être présent dans les cœurs en IC [44, 45]. Par contre, il convient aussi de noter que l'IC est également associée à une perte générale de myocytes, entre autres via un processus d'apoptose. Pour cette raison, la prolifération des myocytes est difficile à mesurer et de savoir si le phénomène d'hyperplasie se produit véritablement en IC est présentement hautement controversée.

Figure 5: Organisation cellulaire du muscle cardiaque en fonction de la progression de l'hypertrophie cardiaque.



(A) Phase précoce d'hypertrophie cardiaque est caractérisée par une augmentation de sarcomères. Les myocytes sont plus larges, mais l'intégrité de l'organisation cellulaire est préservée. (B) À un état plus avancé d'hypertrophie, l'augmentation préférentielle dans la taille et le nombre de certaines organelles (mitochondries), de même qu'un ajout irrégulier de sarcomères dans les myocytes, présagent des anomalies subtiles dans l'organisation cellulaire. (C) L'hypertrophie de long terme démontre des signes nettement plus évidents d'une perturbation de l'organisation cellulaire, tel qu'un nucleus incontestablement élargi avec des membranes lobulées. Ces changements corrompent la structure des myofilaments adjacents. (D) L'état terminal d'hypertrophie cardiaque est caractérisé par une nette perte d'éléments contractiles, une sévère perturbation de l'arrangement parallèle normal des sarcomères, d'une déposition de tissus fibreux et d'une sinuosité généralisée. (Adapté de [46])

Accompagnant le remodelage et les diverses altérations du myocarde survient aussi une perte progressive de myocytes. Cette dernière, qu'elle soit le résultat d'une nécrose, d'une apoptose ou de nature autophagique, contribue à la dysfonction cardiaque et au remodelage.

Le remodelage cardiaque ne se limite pas qu'aux myocytes, car la matrice extracellulaire subit aussi d'importants changements. Comme la matrice extracellulaire myocardique participe à l'intégrité des myocytes, ces changements ont des répercussions structurelles et fonctionnelles cardiaques. La perte progressive des myocytes crée un espace vide qui nécessite une forme de remplissage, donnant lieu à une cicatrisation. Cette dernière engendre une raideur myocardique et entrave la contraction. De plus, ce nouveau réseau de tissu cicatriciel devient un substrat structurel pour des arythmies cardiaques et la mort subite.

Conséquemment, l'inclusion des fibroblastes cardiaques dans la discussion sur le processus du remodelage cardiaque nécessite une mention particulière. Cette lignée cellulaire, constituant 60 à 70% de toutes les cellules d'un cœur humain, est une source clé de plusieurs composants de la matrice extracellulaire cardiaque [47]. Dans un cœur normal, les fibroblastes cardiaques sont principalement reconnus comme régulateurs du métabolisme de cette matrice, vaillant ainsi au maintien de la structure trois-dimensionnelle du myocarde. Dans cet aspect, ces cellules produisent des facteurs de croissance, des cytokines et des métalloprotéinases matricielles qui maintiennent un équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de cette matrice [48]. Afin de conserver l'homéostasie de la matrice extracellulaire cardiaque, les processus constructifs et destructifs du métabolisme de cette matrice sont donc perpétuels [49].

Suite à une offense cardiaque, les fibroblastes cardiaques répondent d'une multitude de façons, incluant: par la transformation en un phénotype myofibroblastique, par la prolifération, la migration, la sécrétion de cytokines et des facteurs de croissance et en altérant le renouvellement de la matrice extracellulaire cardiaque via des changements dans la synthèse, la dégradation et la nouvelle déposition des protéines matricielles [48, 50-52]. De plus, les fibroblastes myocardiques activés sont stimulés par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines proinflammatoires spécifiques, la présence desquels est augmentée dans le cœur lors du remodelage [53]. En réponse à ces stimuli, les myofibroblastes deviennent fortement prolifératifs et invasifs, et participent activement au remodelage par la sécrétion des métalloprotéinases matricielles qui dégradent la matrice extracellulaire et augmentent la déposition d'un nouveau collagène [54].

1.11 À partir des signes et symptômes vers le diagnostic

Puisqu'il n'existe pas d'outil de diagnostic spécifique à l'IC, les possibilités d'une telle pathologie sont émises lorsque les signes et symptômes d'un débit cardiaque détérioré et/ou une surcharge volumique sont documentés dans le cadre d'une fonction cardiaque systolique et/ou diastolique anormale. En conséquence, les patients souffrant d'IC encore non diagnostiquée se présentent habituellement selon l'une des trois façons suivantes: avec une intolérance à l'effort, en surcharge liquidienne ou avec des symptômes provoqués par une autre condition clinique. Les patients du premier groupe sont habituellement incommodés par une réduction de leur capacité motrice due à de la dyspnée et de la fatigue. Cependant, ces symptômes sont non spécifiques et sont souvent attribués au vieillissement, au déconditionnement physique ou à un problème

pulmonaire. Les patients du second groupe se plaignent principalement d'enflures aux extrémités. Comme celles-ci peuvent être le seul symptôme perçu, le diagnostic d'une IC est souvent involontairement omis. Et finalement, les individus du troisième groupe n'ont pas de symptômes d'IC, une dysfonction ventriculaire est détectée de façon imprévue lors d'une visite médicale régulière ou suite à des tests pour une condition distincte. Vu l'aspect nébuleux de la présentation clinique d'un patient en IC et aussi parce que certains patients ne sont pas assez symptomatiques pour consulter tôt dans le développement de cette maladie, le diagnostic d'IC peut être grandement retardé. Puisqu'il est primordial de ralentir la spirale d'événements délétères impliquant le système neurohormonal le plus tôt possible afin de ralentir le remodelage cardiaque, il devient nécessaire de bien connaître la symptomatologie et le dénouement relatifs à l'IC.

L'œdème, la fatigue et la dyspnée représentent donc la triade classique d'IC. En présence de ces symptômes, la tolérance à l'exercice est limitée et la rétention liquidienne entraîne souvent une congestion pulmonaire. Le tableau 1 énumère les signes et symptômes les plus fréquemment observés en IC.

Dans les stades précoces de la maladie, la dyspnée n'est perçue qu'à l'effort; cependant, avec la progression de la maladie, celle-ci survient avec des activités de moins en moins exigeantes pour ultimement être présente même au repos. L'orthopnée est une condition qui découle de la dyspnée et qui survient en position couchée. Ce symptôme se présente généralement plus tardivement dans la maladie et peut être soulagée par une position du corps à la verticale. Les patients souffrant d'orthopnée, la toux nocturne étant sa manifestation la plus fréquente, nécessitent plusieurs oreillers pour dormir, voir même dormir assis. Tout comme

l'orthopnée, la dyspnée paroxystique nocturne réfère à des épisodes aigus de toux et d'essoufflement qui surviennent habituellement pendant la nuit. À l'inverse de l'orthopnée, la dyspnée paroxystique nocturne n'est pas soulagée par une position verticale, laissant le patient incapable de dormir et contribuant par le fait même à la fatigue journalière. Les patients avec l'IC peuvent aussi être affectés par des symptômes gastro-intestinaux comme l'anorexie, la nausée et une satiété précoce accompagnée de crampes abdominales. Les signes neurologiques tels que la confusion ou la désorientation sont observés dans les stades avancés de la maladie, et ce surtout chez des personnes âgées.

Tableau 1: Présentation clinique de l'insuffisance cardiaque

Signes et symptômes communs	Signes et symptômes atypiques
dyspnée	nausées
dyspnée nocturne paroxystique	anorexie
nycturie	oligurie
orthopnée	cyanose
toux	inconfort abdominal
fatigue	altération cognitive
faiblesse	délirium
intolérance à l'effort	
œdème (pulmonaire et/ou des extrémités)	
prise de poids	
distension abdominale	
extrémités froides	

Lors de la présentation d'un individu atteint de plusieurs de ces maux, le clinicien doit alors exclure ou confirmer un diagnostic potentiel d'IC. Cette démarche est généralement accomplie par un examen physique complet, une interrogation sur l'histoire clinique du patient, une compilation des facteurs de risque de maladie cardiaque ainsi que plusieurs investigations tant invasives que non invasives.

Un test de marche ou un test d'exercice cardio-pulmonaire peut aider dans l'évaluation du pronostic et de la contribution de l'IC à l'intolérance à l'effort. Lors de la présence d'une maladie coronarienne sous-jacente, une angiographie coronarienne, une échographie de stress et/ou une imagerie à perfusion d'isotopes peut s'avérer utile pour constater l'existence et l'étendue d'un IM, d'une zone ischémique et/ou d'une zone viable pouvant justifier des procédures supplémentaires. Une biopsie endomyocardique est rarement effectuée dans le contexte d'IC, sauf pour certains désordres rares de maladie myocardique inflammatoire, et ce surtout chez des patients jeunes ou ceux à considérer pour une transplantation cardiaque.

Une échographie transthoracique et une imagerie au rayon-X sont les examens initiaux puisqu'ils permettent d'évaluer de manière non invasive la fonction ventriculaire systolique et diastolique, l'épaisseur musculaire des chambres cardiaques, la taille des chambres cardiaques, la fonction des valves cardiaques, l'état du péricarde ainsi que la condition pulmonaire. Une échographie couplée au Doppler est d'ailleurs le test diagnostique de prédilection dans l'évaluation de patients en IC. Au-delà de son importance dans le diagnostic, une évaluation échographique complète permet d'établir un niveau de référence pour fins de comparaisons futures au niveau de la progression de la maladie, ainsi qu'au niveau de sa réponse aux stratégies thérapeutiques.

D'autres tests comme l'angiographie, la ventriculographie de contraste, l'imagerie par résonance magnétique ou la tomодensitométrie peuvent être utiles dans certains cas et procurer de l'information additionnelle quant à la nature et la sévérité de la dysfonction cardiaque. Par exemple, la ventriculographie de contraste procure une mesure très précise de la fraction d'éjection du ventricule gauche. De leur côté, la résonance magnétique et la tomодensitométrie

sont très utiles dans l'évaluation de la taille, la structure, la fonction et les mouvements des ventricules, ainsi que dans l'identification de maladies péricardiques.

Finalement, la mesure des taux plasmatiques des peptides natriurétiques, comme le BNP, est utile lorsque le diagnostic est incertain chez un patient présentant de la dyspnée, puisque des concentrations faibles excluent et les concentrations hautes confirment la présence d'IC.

1.12 Causes de l'insuffisance cardiaque

Toute cause qui directement ou indirectement altère la structure et/ou la fonction du ventricule gauche peut prédisposer à l'IC. Dans les pays industrialisés, la maladie coronarienne en est devenue une cause très importante et est responsable de 60 à 75 % des cas. L'hypertension artérielle est également un contributeur majeur de cette maladie [55]. Puisque approximativement un quart de la population nord-américaine est hypertensive et qu'un contrôle optimal de la pression sanguine peut réduire le risque du développement de l'IC jusqu'à 50% [56], les stratégies pour contrôler ce facteur de risque sont primordiales dans la prévention de ce désordre. De plus, à long terme, l'hypertension artérielle induit des altérations structurales cardiaques et mène à l'hypertrophie ventriculaire gauche, un facteur de risque cardiovasculaire indépendant de l'IC [57].

Tableau 2: Causes et facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque

Maladie coronarienne	Autres causes
Infarctus du myocarde	Sarcoïdose
Ischémie du myocarde	Amyloïdose
Surcharge de pression chronique	Hémochromatose
Hypertension artérielle	Phéochromocytome
Obstruction valvulaire	Désordres congénitaux
Cor pulmonale	Agents cardiotoxiques
Surcharge de volume chronique	Iatrogénique
Régurgitation valvulaire	Infectieux
Shunts	Facteurs de risque
États de haut débit	Diabète
Thyrotoxicose	Dyslipidémie
Anémie	Irradiation médiastinale
Béribéri	Abus d'alcool
	Usage de drogues illicites
	Tabagisme
	Obésité
	Arythmies

Chez un quart de patients, la cause exacte d'IC n'est pas connue ou n'est pas initialement évidente. Ces patients sont alors catégorisés comme ayant une IC non-ischémique ou encore, une IC idiopathique.

Avec les avancements technologiques récents, il est devenu apparent qu'un grand nombre de cas de cardiomyopathies dilatées sont secondaires à un défaut génétique. Au-delà de 300

mutations sont décrites actuellement comme pouvant être associées à une cardiomyopathie hypertrophique; la plupart affectant des gènes des protéines du cytosquelette. Il est important de noter ici que l'IC n'équivaut pas à une dysfonction du ventricule gauche ou une cardiomyopathie. Ces derniers décrivent en fait des défectuosités structurales ou fonctionnelles pouvant mener à une IC, mais ne constituent pas en soi de l'IC. Plutôt, comme mentionné auparavant, l'IC est un syndrome clinique caractérisé par des signes (ex. œdème) et symptômes (ex. dyspnée) spécifiques ne pouvant pas être caractérisés par un test diagnostique particulier.

Il va de soi que l'identification d'une condition causant une anomalie cardiaque structurale ou fonctionnelle est très importante, puisque dans certains cas cette condition pourrait être traitable ou réversible. De plus, l'investigation entreprise pour identifier des facteurs prédisposant révèle fréquemment des états connexes qui contribuent ou exacerbent les symptômes d'IC. Cette investigation débute par une analyse exhaustive d'antécédents médicaux ainsi qu'un examen physique complet avec une attention particulière aux éléments énumérés dans le tableau 2. Les analyses de laboratoires sont également indispensables dans la prise en charge initiale d'un patient, ainsi que dans le suivi de l'évolution de sa condition.

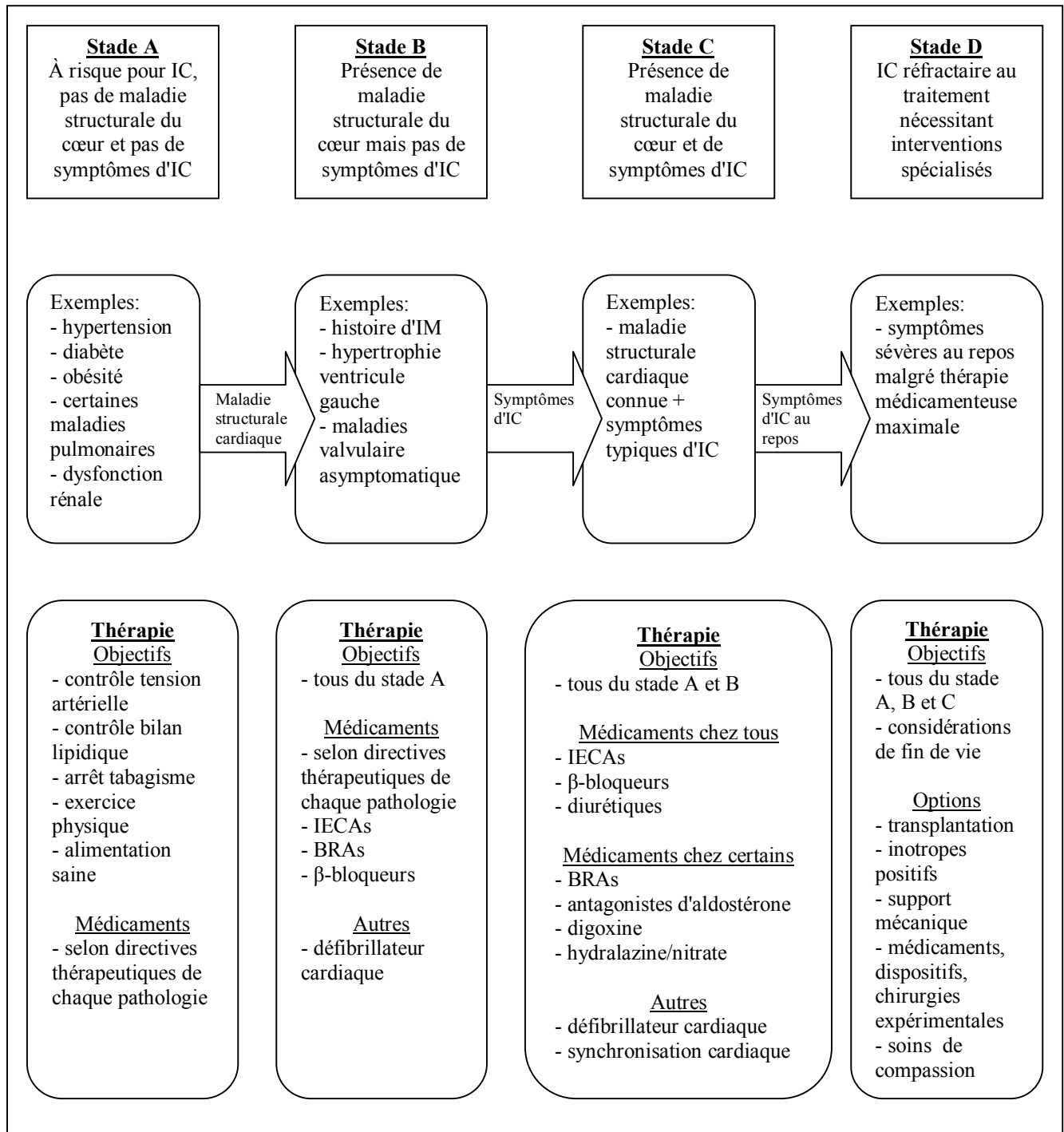
1.13 Traitement de l'insuffisance cardiaque

L'IC est une maladie chronique et progressivement débilitante. À ce titre, à moins d'une transplantation cardiaque, il n'existe présentement pas de cure pour cette condition. Puisque certaines conditions responsables de l'anomalie cardiaque structurelle ou fonctionnelle sont réversibles, leur identification et correction tôt dans les différents stades de la maladie est

d'importance capitale. Ainsi, toute anomalie nutritionnelle, hormonale, sanguine et/ou arythmique corrigible, devrait être recherchée et corrigée promptement. Les patients devraient s'abstenir d'utiliser des produits du tabac et limiter leur consommation d'alcool à 2 consommations par jour. La prise de médicaments connus pour aggraver l'IC devrait être cessée, si possible.

Le traitement actuel repose sur trois grands objectifs, soit: 1) la prévention, 2) le soulagement de signes et symptômes et 3) l'amélioration du pronostic. Les stratégies utilisés présentement pour atteindre ces objectifs sont de l'ordre pharmacologique, chirurgical et au moyen de dispositifs intracardiaques. Le choix de l'option thérapeutique à utiliser fait foi d'un système de classification qui est un guide dans l'application des choix thérapeutiques (figure 6). Ce système de classification est composé de quatre stades impliqués dans le développement et la progression de l'IC. Les deux premiers (A et B) identifient des situations et des comportements à risque pour le développement de l'IC et en soi ne constituent pas encore le syndrome d'IC clinique. Ce dernier est clairement apparent dans les deux stades ultérieurs (C et D).

Figure 6: Système de classification de stades dans le développement de l'insuffisance cardiaque.



BRAs: Bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II; IC: insuffisance cardiaque; IECAs: Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; IM: Infarctus du myocarde. (Adapté de [58])

Selon ce système de classification, les stades A et B font référence au premier objectif, soit la prévention. Ce stade correspond à toute personne comportant des facteurs de risque pouvant mener vers une IC. Il s'agit donc d'enrayer, traiter ou du moins contrôler les facteurs de risque modifiables. À ce titre, les éléments les plus critiques à surveiller au niveau de la population nord-américaine sont l'hypertension artérielle, le diabète, le syndrome métabolique et l'athérosclérose. Comme mentionné auparavant, l'hypertension artérielle est devenue un fléau de notre société et devrait être dépistée tôt, prise en charge rapidement, contrôlée adéquatement et suivie régulièrement et vigoureusement. Le traitement de l'hypertension artérielle devrait être en accord avec les lignes directrices nationales les plus récentes. Même si le but primaire et global du traitement de l'hypertension artérielle reste le contrôle des pressions systoliques et diastoliques, le choix thérapeutique et les valeurs visées doivent toujours prendre en considération des problèmes médicaux concomitants (ex. diabète). Alors que l'obésité et la résistance à l'insuline sont d'importants facteurs de risque de l'IC [59] qui mènent souvent au diabète, ce dernier augmente nettement la probabilité de l'IC chez des patients au stade A [60] et affecte négativement ceux au stade C [61]. Même si un contrôle étroit de l'hyperglycémie n'a pas été démontré comme réduisant le risque de passage au stade C, sa prise en charge adéquate peut diminuer le développement de certains problèmes rénaux [62] ou d'IM [63]; deux complications particulièrement néfastes en IC. Concernant le syndrome métabolique, c'est un amalgame de divers facteurs de risque cardiovasculaires chez un même individu qui est caractérisé par la présence d'au moins trois critères suivants: 1) adiposité abdominale, 2) hypertriglycémie, 3) taux de HDL bas, 4) tension artérielle surélevée ou 5) hyperglycémie à jeun [36]. Alors que le traitement isolé de certains de ces critères réduit le risque d'une maladie cardiovasculaire et d'une IC subséquente, diverses études évaluent présentement la meilleure approche pour une prise en charge synchronisée de ce syndrome [64]. Du côté de l'athérosclérose, les patients affectés sont

très susceptibles de développer de l'IC éventuellement et devraient ainsi avoir leurs risques vasculaires contrôlés selon les lignes directrices actuelles. Au-delà des mesures préventives mentionnées ci-haut, les patients au stade A du système de classification du développement de l'IC devraient être conscients des effets cardiotoxiques des agents comme le tabac, la cocaïne, les amphétamines et autres drogues illicites. [36]

Les patients qui sont asymptomatiques mais qui ont des évidences d'une anomalie structurale du cœur ou qui ont jadis subi un IM sont d'autant plus à risque de progresser vers les stades subséquents. Ces patients bénéficient alors de stratégies qui réduisent leur risque de lésions cardiovasculaires additionnelles afin de retarder, ou idéalement arrêter, l'évolution de leur état clinique. Par conséquent, les mesures initiales incluent toutes celles applicables aux patients au stade A. Les modalités additionnelles dépendent alors de la cause impliquée dans les changements structuraux cardiaques décelés. Il est aussi clair que ces patients nécessitent souvent un suivi médical plus étroit. En termes de traitement de certains facteurs de risque, alors que les lignes directrices énoncent les choix thérapeutiques possibles, les β -bloqueurs, les IECAs et/ou les BRAs sont habituellement considérés comme des médicaments à privilégier chez ces patients. [36]

Lorsqu'une personne développe une anomalie structurale cardiaque et présente des symptômes cliniques d'IC (stades C et D), la prise en charge nécessite l'évaluation de la capacité fonctionnelle du patient pour estimer son degré de limitation physique. Celui-ci sera classifié selon la classification fonctionnelle de la "New York Heart Association" (NYHA) (tableau 3), qui est une mesure validée et simple pour juger de la sévérité clinique d'IC. Même si la classification fonctionnelle selon la NYHA est un outil différent du système de classification d'IC mentionnée

ci-haut, elle s'intègre parfaitement aux stades C et D (quoique la classe I ferait encore partie du stade B). Selon la NYHA, un patient avec une IC serait assigné à une des quatre classes fonctionnelles selon le degré d'effort nécessaire pour provoquer des symptômes. Dû à la nature progressive de la maladie, à long terme, la classe fonctionnelle d'un individu tend à se détériorer. Par contre, dans la grande majorité de patients, cette dégradation d'état clinique n'est typiquement pas en constante et uniforme détérioration. Ainsi, chez plusieurs, la sévérité des symptômes fluctue constamment à la hausse ou à la baisse et ce même en absence de quelconque intervention. Cependant, comme certains traitements maintenant indiqués dans la prise en charge de l'IC ont démontré de l'efficacité sur la qualité de vie des patients, l'utilité de la NYHA est grandement appréciée dans l'instauration et les ajustements de diverses thérapies, ainsi que dans le suivi de l'état clinique du patient.

Tableau 3: Classification fonctionnelle selon la "New York Heart Association"

Classe	Définition
I	Pas de symptômes limitant les activités ordinaires
II	Symptômes avec activités ordinaires
III	Symptômes avec activités moins qu'ordinaires
IV	Symptômes au repos ou avec activités minimales

(Tiré de [65])

1.14 Traitement non-pharmacologique

La prise en charge d'un patient en IC commence par des mesures non-pharmacologiques, soit: l'exercice physique, la restriction en eau et en sel, la gestion du poids corporel et la prise en charge par une équipe multidisciplinaire dans une clinique d'IC externe. [65]

Quoique la plupart des patients en IC ne devraient pas s'engager dans des tâches trop intenses ou des sports exhaustifs (i.e. >80% de fréquence cardiaque maximale) [36, 65], les recommandations actuelles dictent une pratique d'exercice physique régulière pour tout patient en IC stable (classe NYHA I-III) afin d'empêcher le déconditionnement physique, ce qui pourrait défavorablement affecter leur tolérance à l'effort [66]. Concrètement, des sessions de 30 à 45 minutes par jour de trois à cinq fois par semaine sont recommandées pour la plupart des patients [65]. Cette prise de position est complètement à l'inverse de la pratique des années '80s. Jadis, on déconseillait aux patients atteints d'IC de pratiquer toute activité physique dans l'espoir de minimiser les symptômes de la maladie et pour protéger le cœur déjà endommagé [67]. Depuis, des programmes d'entraînement se sont avérés sécuritaires et bénéfiques pour améliorer la capacité d'exercice globale, la morbidité et la survie chez certains individus [68].

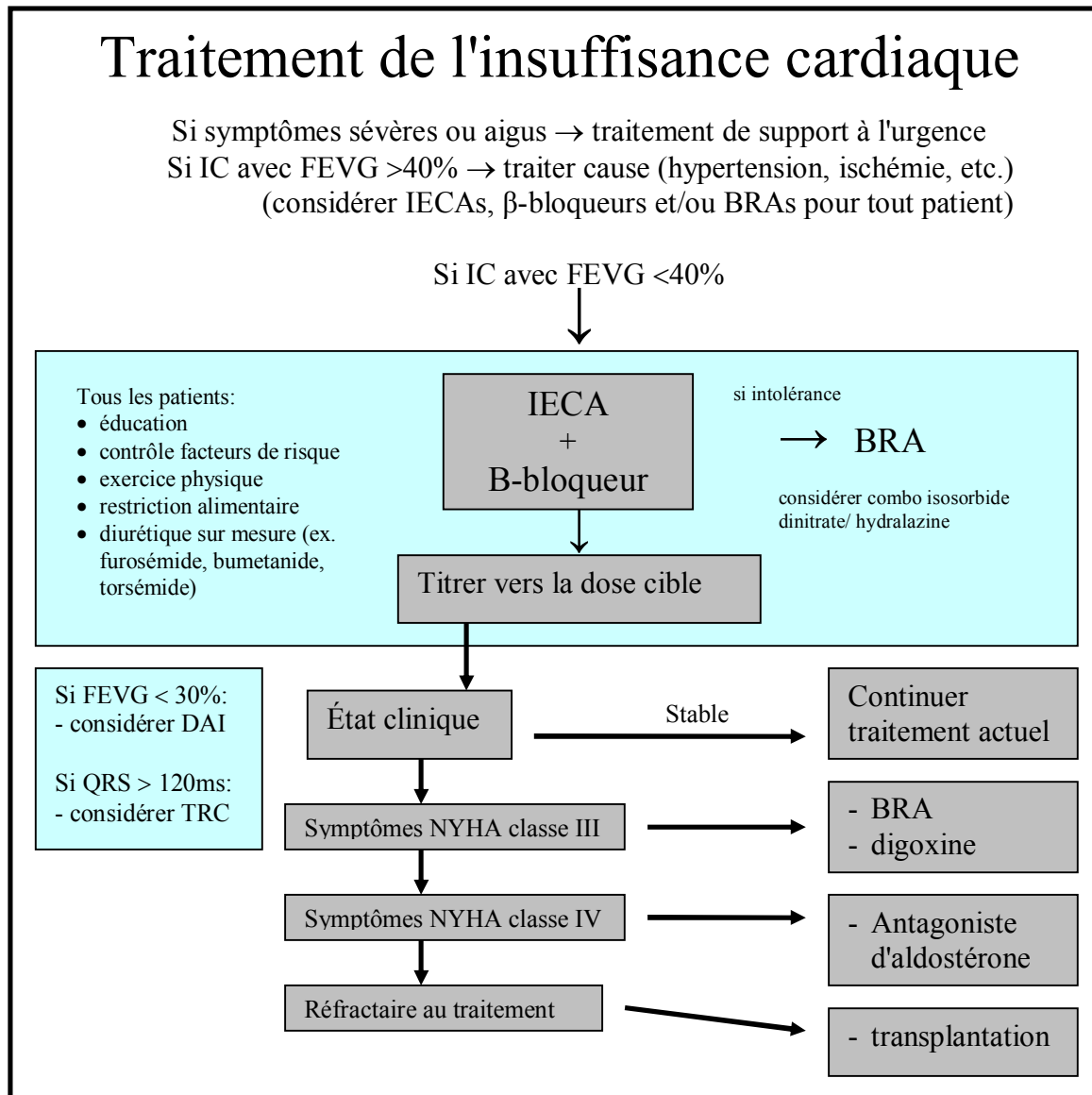
La restriction en eau et en sel va de pair avec la gestion du poids corporel. Tout patient en IC symptomatique devrait limiter son apport quotidien en sel et suivre une diète n'excédant pas les trois grammes de sel par jour [65, 69]. Les patients avec une IC plus avancée pourraient même se voir imposer une diète sans sel, soit à moins de deux grammes de sel par jour [65, 69]. La

gestion du poids est directement reliée à la rétention en eau donnant suite à une congestion qui provient dans la plupart des cas d'une mauvaise adhérence à la diète ci-haut mentionnée. Ce problème peut être, jusqu'à un certain point, contrôlé par des diurétiques, mais il devient extrêmement difficile à gérer lors de l'apparition d'une condition qui accompagne souvent l'IC, soit l'insuffisance rénale. Cela étant dit, les patients sont avisés de surveiller leur poids quotidiennement, car celui-ci reflète bien leur équilibre en eau corporelle. Une restriction en liquides n'excédant pas les deux litres par jour pourrait être de mise chez ceux dont la rétention en eau devient difficile à gérer malgré l'utilisation intense de diurétiques [65].

La prise en charge par une équipe multidisciplinaire composée de professionnels de la santé avec une expertise en IC est fortement recommandée, surtout chez ceux dans un état plus avancé de la maladie. Un tel personnel fournit l'éducation nécessaire au patient, assure une prise en charge adéquate et adaptée au patient et permet un suivi des interventions plus serré. Selon une récente analyse, ces mesures se sont avérées bénéfiques au niveau de la diminution de la mortalité de toute cause chez certains individus atteints d'IC [70].

1.15 Traitement pharmacologique

Figure 7: Algorithme de traitement de l'insuffisance cardiaque.



BRA: bloqueur du récepteur de l'angiotensine II; DAI: défibrillateur automatique implantable; IC: insuffisance cardiaque; IECA: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine; FEVG: fraction d'éjection du ventricule gauche; NYHA: classification fonctionnelle selon la "New York Heart Association"; QRS: complexe QRS sur l'électrocardiogramme; TRC: thérapie de resynchronisation cardiaque. (Adapté de [65])

Concomitamment, et généralement avant même que les mesures non-pharmacologiques soient transmises et appliquées, la prise en charge d'individus en IC repose sur les divers traitements pharmacologiques (figure 7). De prime à bord, ces patients doivent être immunisés annuellement contre l'influenza et à chaque cinq ans contre le pneumocoque, afin de minimiser le risque d'une infection respiratoire qui pourrait s'avérer très dommageable, et même fatale, pour le patient [65]. Ensuite, il est d'importance capitale que le patient cesse tout médicament ou thérapie qui sont contre-indiqués ou présumés causer du tort en IC. Dans un tel cas, une alternative sécuritaire devrait être envisagée. Trois classes de médicaments sont présentement ciblées par ces mesures. La première comprend les agents anti-arythmiques car ils peuvent induire des effets pro-arythmiques et cardio-dépressifs, et ce surtout chez des individus avec une FEVG déprimée [71, 72]. De ce groupe, seuls l'amiodarone [73] et le dofétilide [74] sont considérés comme neutres sur la survie des patients avec l'IC (voir section 1.15.6). La deuxième classe est celle des bloqueurs des canaux calciques, principalement ceux de type non-dihydropyridine (i.e. vérapamil, diltiazem), qui peuvent induire une détérioration de l'IC et qui ont été associés à une augmentation d'événements cardiovasculaires dans ce contexte [75]. Cependant, dans cette classe, certains de ceux qui sont vasosélectifs pourraient être exclus de cette recommandation (i.e. amlodipine) [76]. Et finalement, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens peuvent causer une rétention sodique et une vasoconstriction périphérique, ce qui amenuiserait l'efficacité et augmenterait la toxicité des diurétiques et des IECAs [77, 78]. L'aspirine à basse dose serait la seule exception de ce groupe [79].

Comme la plupart des manifestations cliniques d'IC résultent d'une rétention excessive en eau et en sel, la prise en charge de l'équilibre liquidien devient nécessaire afin de limiter les

symptômes de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients. Les diurétiques réduisent la congestion pulmonaire et l'œdème périphérique et améliorent la fonction cardiaque, les symptômes et la tolérance à l'exercice [80, 81]. Alors qu'aucune étude n'est parvenue à démontrer leur effet positif en ce qui a trait à la mortalité dans l'IC, les diurétiques sont indispensables dans cette maladie, et ce de plus en plus et au fur et à mesure que cette dernière progresse vers les stades avancés. Un usage approprié des diurétiques est un élément fondamental dans le succès des autres médicaments utilisés en IC.

Suite à plusieurs grandes études cliniques, la thérapie pharmacologique de l'IC repose actuellement sur deux grandes classes de médicaments, soit: les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et les β -bloqueurs (tableau 4). Ces deux classes sont considérées comme un traitement standard et devraient être utilisées chez pratiquement tous patients atteints d'IC, à moins d'une contre-indication majeure. Peu importe leur ordre et moment d'initiation, ils devraient être débutés aussitôt que la condition du patient le permet; généralement, ce choix est individualisé au patient afin de maximiser la tolérabilité et la persistance à long terme au traitement. Puisque la majorité des études cliniques a évalué les IECA d'abord, ceux-ci sont généralement débutés en premier. Cependant, c'est surtout les comorbidités, la fréquence cardiaque et la pression artérielle qui dictent quelle classe de médicaments sera priorisée. Par ailleurs, en clinique, les deux sont souvent débutés de façon concomitante et les doses sont augmentées progressivement pour atteindre, au mieux, les doses-cibles ou, au pire, les doses maximales tolérées. À ce traitement de base s'ajoutent d'autres thérapies médicamenteuses qui peuvent y être rajoutées ou qui servent de substitut dans certaines conditions particulières. Ces thérapies sont: les bloqueurs des récepteurs d'angiotensine (BRA), les antagonistes d'aldostérone,

la combinaison d'isosorbide dinitrate avec l'hydralazine, la digoxine et certains antiplaquettaires (ex. acide acétylsalicylique, clopidogrel) ou anticoagulants (ex. warfarine) [36, 65, 69].

Tableau 4: Médicaments utilisés en insuffisance cardiaque

Médicament	Dose initiale	Dose cible
IECAs		
captopril	6.25 – 12.5 mg tid	25 – 50 mg tid
énalapril	1.25 – 2.5 mg bid	10 mg bid
ramipril	1.25 – 2.5 mg bid	5 mg bid
lisinopril	2.5 – 5 mg qd	20 – 35 qd
trandolapril	1 mg qd	4 mg qd
périndopril	2 mg qd	8 – 16 mg qd
fosinopril	5 – 10 mg qd	40 mg qd
quinapril	5 mg bid	20 mg bid
β-bloqueurs		
carvédilol	3.125 mg bid	25 mg bid
bisoprolol	1.25 mg qd	10 mg qd
métoprolol succinate CR/XL	12.5 – 25 mg qd	200 mg qd
BRAs		
candésartan	4 mg qd	32 mg qd
valsartan	40 mg bid	160 mg bid
losartan	25 – 50 mg qd	50 – 100 mg qd

Antagonistes d'aldostérone

spironolactone	12.5 mg qd	25 – 50 mg qd
éplérenone	25 mg qd	50 mg qd

Autres

isosorbide dinitrate &	20 mg tid &	40 mg tid &
hydralazine	37.5 mg tid	75 mg tid
digoxine	0.065 mg qd	N/A
acide salicylique	80 mg qd	80 mg qd
diurétique de l'anse	furosémide – 40 mg qd	selon signes et symptômes
(furosémide, torsémide,	torsémide – 10 mg qd	
bumétanide)	bumétanide – 1 mg qd	

bid, deux fois par jour; BRAs, bloqueurs des récepteurs d'angiotensine; CR/XL, libération contrôlée/libération prolongée (de l'anglais: controlled release/extended release); IECA, inhibiteurs de l'enzyme de conversion d'angiotensine; N/A, non applicable; qd, une fois par jour; tid, trois fois par jour. (Tiré de [65])

1.15.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

Les IECAs interfèrent avec le SRAA en inhibant l'enzyme responsable de la formation de l'angiotensine II, l'ECA, un joueur majeur dans la pathogénèse de l'IC. D'ailleurs, puisque les IECAs inhibent aussi la dégradation de la bradykinine, plusieurs soutiennent que leur effet va au-delà de la simple suppression d'angiotensine II [82, 83]. Le nombre important d'études soutenant l'utilisation des IECAs chez des patients en IC est sans équivoque. Ces molécules ont été évaluées chez plus que 70 000 patients qui ont participé à plus que 30 études cliniques [84]. Cependant, il

ne faut pas omettre de mentionner que toutes ces études ont recruté des individus avec une FEVG abaissée (<35 à 40%) et que les patients avec une dysfonction rénale, des pressions artérielles limites ou une fonction systolique préservée ne représentaient qu'une faible proportion des patients étudiés.

Les effets bénéfiques des IECAs en IC surviennent de leur habileté à freiner le remodelage ventriculaire, améliorer les symptômes des patients, diminuer les hospitalisations et prolonger la survie. Cette efficacité des IECAs a été démontrée à maintes reprises par plusieurs études cliniques, et ce en IC de diverses causes, ainsi qu'à différents stades de sévérité de dysfonction ventriculaire gauche. Les études SOLVD [24], SAVE [85] et TRACE [86] ont établi que les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche asymptomatique progressent moins rapidement vers des états d'IC symptomatique et subissent moins d'hospitalisations lorsque traités avec un IECA. Les IECAs ont aussi été démontrés efficaces chez les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche symptomatique. Le tableau 5 rapporte que tous les essais cliniques de grande envergure ont rapporté une diminution de la mortalité, et ce même dans des stades de maladie avancée, tel que chez des patients en class IV de la NYHA dans l'étude CONSENSUS I [87].

Le rôle indéniable de cette classe thérapeutique dans l'IC fût établi lorsqu'il fut apparent que les bénéfices des IECAs allaient au-delà de leur action vasodilatatrice. Ainsi, il est désormais inapproprié de penser qu'un autre traitement antihypertenseur pourrait être équivalent en se basant uniquement sur la baisse de la pression artérielle. Conséquemment, l'administration des IECAs est indiquée même en absence d'hypertension artérielle. Pareillement, l'usage des doses

qui seraient considérés sous-thérapeutiques dans un autre contexte est encouragé lorsque ces doses sont des doses maximales tolérables, à défaut de ne pas en donner. Cette ligne de pensée provient des résultats de l'étude V-HeFT-II [88], dans la mesure où des sujets traités avec une faible dose d'IECA obtiennent des gains en survie plus importants que ceux traités avec une combinaison vasodilatatrice d'hydralazine et d'isosorbide dinitrate.

Tableau 5: Résumé des essais cliniques pertinents pour l'insuffisance cardiaque avec fonction systolique détériorée.

Nom de l'essai	Régime thérapeutique	Classe NYHA	Participants	Durée (mois)	Effet sur mortalité	Valeur-p
Inhibiteurs d'enzyme de conversion d'angiotensine						
<i>Insuffisance Cardiaque</i>						
CONSENSUS-1	Énalapril vs. placebo	IV	253	6 (terminée précocement)	↓ 40 %	0.002
SOLVD-Traitement	Énalapril vs. placebo	I-III	2569	41	↓ 16%	0.004
SOLVD-Prévention	Énalapril vs. placebo	N/A	4228	37	NS	NS
V-Heft-II	Énalapril vs. hydralazine/isosorbide dinitrate	I-III	804	30	↓ 14%	0.08
ATLAS	Lisinopril haute dose vs. faible dose	II-IV	3164	60	↓ 8% (haute dose)	0.13

Post-Infarctus du Myocarde

SAVE	Captopril vs. placebo	N/A	2231	42	↓ 19%	0.02
AIRE	Ramipril vs. placebo	N/A	2006	15	↓ 27%	0.002
TRACE	Trandolapril	N/A	2606	36	↓ 22%	0.001

Bloqueurs des récepteurs d'angiotensine II***Insuffisance Cardiaque***

Val-HeFT	Valsartan vs. placebo	II-IV	5010	23	NS	NS
CHARM-Alternatif	Candésartan vs. placebo	II-IV	2028	34	↓ 14%	0.11
CHARM-Ajouté	Candésartan vs. placebo	II-IV	2548	41	↓ 11%	0.09
ELITE-II	Losartan vs. Captopril	II-IV	3152	19	↑ 13%	0.16

Post-Infarctus du Myocarde

VALIANT	Valsartan vs. Captopril	N/A	14703	25	NS	NS
---------	-------------------------	-----	-------	----	----	----

Antagonistes d'Aldostérone***Insuffisance Cardiaque***

RALES	Spironolactone	III, IV	1663	24 (terminée précocement)	↓ 30%	<0.001
-------	----------------	---------	------	---------------------------	-------	--------

Post-Infarctus du Myocarde

EPHESUS	Éplérénone	N/A	6642	16	↓ 15%	0.005
---------	------------	-----	------	----	-------	-------

β-bloqueurs***Insuffisance Cardiaque***

CIBIS-I	Bisoprolol vs. placebo	III, IV	641	23	↓ 20%	0.22
U.S. Carvedilol	Carvédilol vs. placebo	II-IV	1094	6 (terminée précocement)	↓ 35%	<0.001
CIBIS-II	Bisoprolol vs. placebo	III, IV	2647	16 (terminée	↓ 33%	<0.001

				précocement)		
MERIT-HF	Métoprolol CR vs. placebo	II-IV	3991	12 (terminée précocement)	↓ 33%	0.006
BEST	Bucindolol vs. placebo	III, IV	2708	24 (terminée précocement)	↓ 10%	0.1
COPERNICUS	Carvédilol vs. placebo	III,IV	2289	10 (terminée précocement)	↓ 35%	0.001
COMET	Carvédilol vs. Métoprolol	II-IV	3029	58	↓ 17%	0.002
<i>Post-Infarctus du Myocarde</i>						
CAPRICORN	Carvédilol vs. placebo	N/A	1959	16	↓ 23%	0.03

AIRE = Acute Infarction Ramipril Efficacy; ATLAS = Assessment of Treatment with Lisinopril and Survival; BEST = β -blocker Evaluation of Survival Trial; CAPRICORN = Carvedilol Post-Infarct Survival Control in Left Ventricular Dysfunction; CHARM = Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity; CIBIS = Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study; COMET = Carvedilol Or Metoprolol European Trial; CONSENSUS = Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study; COPERNICUS = Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival; ELITE = Evaluation of Losartan In The Elderly; EPHEUS = Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study; MERIT-HF = Metoprolol CR/XL Randomized Interventional Trial in Congestive Heart Failure; N/A: non applicable; NS = non significatif; NYHA = classification fonctionnelle selon la New York Heart Association; RALES = Randomized Aldactone Evaluation Study; SAVE = Survival and Ventricular Enlargement; SOLVD = Studies of Left Ventricular Dysfunction; TRACE = Trandolapril Cardiac Evaluation; Val-HeFT = Valsartan Heart Failure Trial; VALIANT = Valsartan In Acute Myocardial Infarction ; V-HeFT = Vasodilator Heart Failure Trial.

Plusieurs IECAs peuvent présentement être considérés dans le traitement de l'IC (tableau 4) et l'un d'eux devrait être administré chez tout patient en IC suite à une dysfonction ventriculaire systolique avec une FEVG réduite. Les seules exceptions à cette règle sont un antécédent d'effet secondaire mortel (ex. angioœdème ou insuffisance rénale anurique) relié à un usage antérieur ou chez des patientes avec une grossesse confirmée. L'effet secondaire majeur lors d'administration d'un tel médicament est une chute de la pression artérielle pouvant entraîner une hypotension symptomatique. Cette situation survient surtout lorsque les IECAs sont introduits à une dose trop élevée ou lorsque celle-ci est augmentée trop rapidement pour atteindre la dose-cible. Il s'agit alors de réduire la dose utilisée ou d'espacer son administration des autres médicaments pouvant abaisser la tension artérielle qui sont pris en concomitance par le patient. Le plus souvent, les doses des diurétiques seront réajustées ou les autres médicaments, comme des nitrates à longue-action ou les inhibiteurs des canaux calciques, seront cessés. Néanmoins, les IECAs devraient toujours être débutés à des doses faibles qui seront par la suite lentement et graduellement augmentés pour atteindre les doses démontrées comme efficaces lors des grandes études cliniques.

La deuxième précaution à prendre lors d'administration des IECAs est une augmentation possible des taux de créatinine sérique. Il n'est pas inattendu que cette dernière puisse monter jusqu'à 30% après l'introduction de ce type de médicament [65]. Si cette élévation se stabilise en-dessous de cette valeur, aucun ajustement particulier n'est nécessaire, mais un suivi plus étroit de la fonction rénale est requis [65]. Toutefois, si cette augmentation franchit ce seuil, une diminution de dose ou même l'arrêt temporaire du médicament pourrait être nécessaire.

Finalement, la rétention potassique, la toux et l'angioedème sont des manifestations secondaires reconnus avec l'utilisation de cette classe de médicaments.

1.15.2 Bêta-bloqueurs

Après son évaluation chez plus de 20 000 patients participant dans plus de 20 études cliniques, la thérapie avec β -bloqueurs représente aujourd'hui une avancée majeure dans la prise en charge des patients en IC avec un FEVG déprimée. Par conséquent, les β -bloqueurs se sont taillé une place dans la prise en charge pharmacologique d'IC comme étant un traitement indispensable et obligatoire chez tout patient en IC symptomatique ou non avec une FEVG déprimée, à moins de contre-indications majeures.

Trois β -bloqueurs sont présentement approuvés pour le traitement de l'IC, soit: le métoprolol succinate à libération soutenue, le bisoprolol et le carvedilol (tableau 4). Alors que les deux premiers bloquent compétitivement et sélectivement le β_1 -ADR, le carvedilol bloque le β_1 -ADR, le β_2 -ADR et l' α_1 -ADR.

Causant un effet inotrope négatif, les β -bloqueurs ont jadis été contre-indiqués en IC en raison des craintes qu'un tel traitement provoquerait une décompensation cardiaque et empirerait l'état clinique du patient. La première étude à démontrer le contraire fût l'étude MDC [89], utilisant le métoprolol à libération régulière chez des patients en IC symptomatique suite à une cardiomyopathie dilatée idiopathique. Même si la tendance vers une diminution de mortalité ou une transplantation cardiaque n'a que faiblement atteint le seuil de significativité, l'avantage

majeur de ce traitement émanait d'une augmentation de la FEVG, d'une augmentation de la tolérance à l'exercice et de la réalisation qu'un tel type de thérapie était bien toléré en IC. Subséquemment, la formulation de métoprolol fût revue et améliorée en métoprolol succinate CR/XL, permettant un dosage uni-quotidien. Tout doute vis-à-vis l'efficacité des β -bloqueurs en IC est tombé suite à la réalisation de l'étude MERIT-HF [90]. Cette dernière utilisa cette nouvelle formulation de métoprolol et démontra un avantage flagrant au niveau de la réduction de la mortalité, et ce, tant chez des sujets plus âgés que des sujets plus jeunes, en IC de cause ischémique ou non, et indépendamment du niveau initial de la FEVG.

Un autre β -bloqueur utilisé dans le traitement de l'IC est le bisoprolol. L'approbation de son utilisation dans cette maladie provient des résultats de l'étude CIBIS-II [91], une étude examinant son effet chez des sujets en IC symptomatique. Semblablement aux résultats de l'étude MERIT-HF, le bisoprolol diminua d'une façon très claire tous les points cliniques évalués, parmi les plus importants étant la mortalité et les hospitalisations de toute cause.

Des trois β -bloqueurs indiqués en IC, le carvédilol fût le plus évalué dans des essais cliniques. D'abord, le "US carvedilol heart failure program" [92], composé de quatre études cliniques, a dû être interrompu précocement lorsqu'un effet très avantageux en faveur du carvédilol sur la survie devint évident. En effet, le risque de décès et le risque d'hospitalisation cardiovasculaire ont été grandement réduits avec ce médicament. Les résultats de l'étude COPERNICUS [93] ont élargis les bienfaits du carvédilol aux patients avec IC plus avancée. Dans cette étude, regroupant des patients avec des FEVGs très basses et en classe IV selon la NYHA, les avantages cliniques apparurent après 4 mois de traitement seulement, obligeant ainsi le comité de sûreté à y mettre un terme précocement. Le carvédilol était aussi évalué chez des

patients avec une dysfonction ventriculaire gauche post-IM lors de l'étude CAPRICORN [94] où il démontra son efficacité en termes de diminution de la mortalité et des IMs subséquents. Finalement, l'étude COMET [95] fût la première à opposer deux β -bloqueurs l'un contre l'autre, soit le carvedilol versus le métoprolol. Puisque dans cette étude le carvedilol procura un avantage significatif en matière de mortalité de toute cause, le métoprolol tartrate à libération rapide ne devrait désormais plus être utilisé en IC.

D'autre part, les résultats de l'étude BEST [96] peuvent nous laisser perplexes. Cette étude évaluait le bucindolol, un β -bloqueur non-sélectif au niveau des récepteurs β avec une activité antagoniste au niveau du α_1 -ADR; une pharmacologie ressemblant beaucoup à celle du carvedilol. Alors que le bucindolol fût inefficace pour diminuer la mortalité dans la population étudiée dans son ensemble, seulement des sujets de race blanche ont pu tirer profit de cette thérapie. Effectivement, au niveau de la population de race noire, qui représentait un quart des sujets participants, la tendance pointait vers une augmentation de mortalité. Comme nous le verrons un peu plus loin, cette réponse différente entre les ethnies serait due au bagage génétique différentiel entre les différentes races.

Ainsi, suite aux résultats de plusieurs de ces études, tout patient atteint d'IC et présentant une FEVG égale ou inférieure à 40% devrait recevoir un traitement avec un β -bloqueur qui a démontré son efficacité dans une étude clinique (tableau 4). Cette classe thérapeutique dérive son efficacité du blocage des effets néfastes d'une activation soutenue du système adrénergique, ce qui semble renverser le processus du remodelage ventriculaire, améliorer la symptomatologie des patients, prévenir les hospitalisations, diminuer la mortalité et prolonger la survie. De plus, ces effets favorables étaient observés chez des individus dont la plupart prenaient des IECAs, ce qui

suggère qu'un blocage combiné de ces deux systèmes neurohormonaux pourrait produire des bienfaits additifs. Par contre, même si ces études étaient composées de plusieurs types de patients, incluant des femmes et des personnes âgées, ainsi que des patients avec des causes et sévérités de dysfonction ventriculaire variées, les patients avec une fonction systolique préservée, des fréquences cardiaques basses (< 65 bpm), des pressions systoliques faibles (< 85 mmHg) et les patients récemment hospitalisés pour décompensation n'étaient pas inclus dans ces études, ou du moins ne représentaient qu'une faible proportion.

Comme c'est le cas pour les IECAs, cette thérapie nécessite une dose initiale faible qui sera progressivement augmentée afin d'atteindre la dose cible. Certaines conditions comme une hypotension symptomatique, une bradycardie symptomatique, une maladie réactive des voies respiratoires sévère ou un bloc atrioventriculaire significatif pourraient retarder ou même empêcher l'utilisation de cette classe médicamenteuse chez un patient. Évidemment, toute autre thérapie, à l'exception d'un IECA, qui par son action pharmacologique empêche l'introduction ou l'augmentation de la dose d'un β -bloqueur devrait être réévaluée, et de préférence cessée.

1.15.3 Bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II

Suite aux différentes études cliniques récentes, les BRAs se sont avérés une solution de rechange intéressante pour des patients ne pouvant pas prendre des IECAs. En fait, pour ceux éprouvant des intolérances comme la toux, l'angioœdème et des rougeurs ou éruptions cutanées suite à la prise d'un IECA, les BRAs représentent des alternatives intéressantes. Tant les IECAs que les BRAs inhibent le SRAA, quoique par des mécanismes différents. Alors que les IECAs

inhibent l'enzyme centrale dans la voie métabolique de ce système, l'ECA, les BRAs bloquent ce système à son apogée, en bloquant le récepteur d'angiotensine II de type 1 (AT_1); le récepteur responsable de virtuellement tous les effets délétères du SRAA sur le système cardiovasculaire.

Le rationnel derrière le développement des BRAs peut être attribué à plusieurs éléments. Premièrement, malgré la présence d'un IECA, la production d'angiotensine II continue à se faire, soit par des voies alternatives, soit par l'échappement à un blocage complet de l'ECA [97]. Deuxièmement, plusieurs sont d'avis qu'une inhibition du SRAA sans accumulation de bradykinine procurerait tous les avantages escomptés en minimisant des effets secondaires [98]. Certaines études ont même démontré que les BRAs sont aussi efficaces que les IECAs au niveau de la morbidité, de la mortalité, du pronostic, de l'amélioration symptomatologique et du ralentissement du remodelage ventriculaire [99-102]. Par contre, les IECAs sont préférés aux BRAs comme traitement initial bloquant le SRAA due au plus grand poids d'évidence scientifique en leur faveur. Par contre, comme c'est le cas avec les IECAs, la chute de pression artérielle, la fonction rénale et la kaliémie pourraient compliquer le traitement aux BRAs. Ainsi, des patients susceptibles à ces effets secondaires avec des IECAs, le seront fort possiblement aussi avec les BRAs.

Trois BRAs ont été évalués de façon significative en IC, soit: le losartan, le valsartan et le candésartan. Ce dernier fût particulièrement efficace au niveau de la réduction de la mortalité cardiovasculaire et des hospitalisations pour l'IC dans le bras "alternatif" de l'étude CHARM [99]. Des résultats similaires ont été démontrés avec le valsartan dans l'étude Val-HeFT [101], mais seulement chez ceux ne recevant pas un IECA comme thérapie d'arrière-plan. Lorsque comparé face-à-face à un IECA dans l'étude ELITE-II [103], le losartan fût aussi efficace que ce dernier en

termes de survie et pratiquement tous les autres points cliniques évalués. Par contre, comme cette étude fût basée sur un modèle statistique de supériorité du losartan, les résultats non-significatifs n'ont pu être considérés comme démontrant une équivalence entre les traitements. À l'inverse, l'étude VALIANT [100], basée sur un modèle statistique de non-infériorité, démontra que le valsartan était "aussi efficace qu'un" IECA chez des patients post-IM qui développaient une dysfonction ventriculaire gauche. De façon générale, suite aux résultats modestes de CHARM-added [104], l'ajout d'un BRAs à une pharmacothérapie comportant déjà un IECA ne procure que peu d'avantages tangibles, et peut même causer du tort en augmentant les chances d'effets secondaires. Les BRAs conservent donc surtout une place de substitut d'IECA dans l'armamentarium pharmacothérapeutique de l'IC.

Lorsque initiés chez un individu, pratiquement les mêmes précautions devraient être prises avec les BRAs qu'avec les IECAs. Les doses initiales faibles sont progressivement augmentées pour atteindre celles démontrées comme efficaces dans les grandes études cliniques.

1.15.4 Antagonistes de l'aldostérone

Aussi appelés les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes, la spironolactone et l'éplérénone sont en fait des diurétiques épargneurs de potassium de faible puissance. Deux études cliniques de grande envergure ont démontré que ces deux agents ont des effets importants au niveau de la mortalité et la morbidité cardiovasculaire en vertu de leur habilité à contrecarrer l'effet nocif de l'aldostérone. Donc, ces molécules sont utilisés en IC plutôt pour freiner le SRAA, que pour leurs propriétés diurétiques. Même si les IECAs diminuent initialement la sécrétion

d'aldostérone, à la longue les niveaux d'aldostérone remontent et atteignent des niveaux similaires à ceux avant l'administration des IECA [105].

Une des premières évidences de l'efficacité des inhibiteurs d'aldostérone en IC provient de l'étude RALES [106]. Cette dernière évalua l'effet de la spironolactone à bas dosage chez des patients en IC avancée (NYHA III et IV). Cette molécule a été associée à une diminution de 30% de la mortalité de toute cause, ainsi qu'une diminution de 35% d'hospitalisations pour détérioration clinique. Même si la spironolactone fût bien tolérée par la majorité des patients, jusqu'à 10% d'hommes étaient ennuyés par de la gynécomastie; un développement excessif des glandes mammaires. Pour surmonter ce genre d'effet secondaire, l'éplérénone fût développée; cette molécule, étant plus sélective pour le récepteur minéralocorticoïde que pour les récepteurs stéroïdiens [107]. L'éplérénone produit donc moins d'effets indésirables liés aux hormones sexuelles.

La deuxième grande évidence de l'efficacité des inhibiteurs d'aldostérone dans l'IC est provenue de l'étude EPHESUS [108]. Cette étude évaluait l'effet de l'éplérénone chez des patients post-IM compliqué par de la dysfonction cardiaque et l'IC. La mortalité de toute cause, la mortalité de causes cardiovasculaires et l'hospitalisation pour événements cardiaques furent diminuées dans le groupe traité par cette molécule. Comme prévu, la gynécomastie n'était pas un problème dans cette étude. L'efficacité de l'éplérénone chez des patients en IC moins avancée est présentement en investigation dans l'étude EMPHASIS [109].

Suite aux données probantes de ces études, l'usage des antagonistes d'aldostérone est recommandé pour les patients en IC avancée et qui reçoivent déjà des IECAs et des β -bloqueurs.

Cependant, les niveaux de potassium sanguin et la fonction rénale rendent l'usage de cette classe médicamenteuse plus difficile à gérer.

1.15.5 Combinaison de l'isosorbide dinitrate et de l'hydralazine

La logique derrière l'utilisation de cette combinaison est de produire une vasodilatation à la fois artérielle et veineuse. L'isosorbide dinitrate seul est surtout un veinodilatateur qui diminue les symptômes de dyspnée et d'intolérance à l'effort [110]. Le désavantage majeur de cette thérapie est le développement assez rapide de tolérance, requérant des périodes sans nitrates. D'autre part, l'hydralazine est un vasodilatateur artériel avec peu d'effets veineux qui semble interférer avec le développement de tolérance aux nitrates [111]. Cette dernière propriété explique en majeure partie le rôle de l'hydralazine dans cette combinaison.

L'usage de la combinaison d'isosorbide dinitrate et d'hydralazine en IC date depuis la démonstration de son effet bénéfique sur la mortalité dans la "Veterans Administration Cooperative Study" [112]. Cependant, cette étude relativement ancienne ne correspondait plus aux pratiques plus courantes car le comparateur n'était composé que d'un diurétique et de la digoxine. Afin de remédier à cette lacune, une autre étude fût entamée, comparant cette fois-ci cette combinaison à un traitement incluant une IECA. L'IECA a alors démontré sa supériorité en termes d'effets bénéfiques sur la survie dans cette étude [88]. Cependant, des analyses rétrospectives ont sensibilisé la communauté scientifique de l'aspect différentiel du dénouement de l'IC chez différentes ethnies. Dans son rapport, Carson et al [113] rapporta que la mortalité et les hospitalisations dues à l'IC sont significativement réduites chez des sujets de race noire qui

reçoivent une combinaison d'isosorbide dinitrate/hydralazine, alors que les sujets de race blanche ne perçoivent aucun avantage suite à ce traitement. Pour éclaircir le rôle de la combinaison d'isosorbide dinitrate/hydralazine, l'étude A-HeFT proposa de la comparer à un régime thérapeutique standard chez une population africaine-américaine [114]. Cette étude a dû être arrêtée précocement suite à une réduction majeure du taux de mortalité et du taux d'hospitalisation pour IC dans le bras traité par cette combinaison. Par contre, comme cette étude n'incluait que des sujets de race noire, l'effet clinique de la combinaison d'isosorbide dinitrate/hydralazine dans d'autres populations déjà traitées avec la thérapie standard incluant un IECA et un β -bloqueur n'est pas connu. Il n'y a cependant pas de raisons de croire que le bénéfice de cette combinaison serait limité qu'aux patients de race noire. Ainsi, cette thérapie pourrait être envisagée dans deux scénarios possibles: en plus de la thérapie standard ou comme solution de rechange à la thérapie standard chez ceux incapables de la tolérer.

Au-delà des résultats cliniques, l'avantage principal de ce type d'étude fût la reconnaissance du besoin d'études dans le domaine de la médecine génomique. Le champ de la pharmacogénétique (ou pharmacogénomique) suggère que des variances dans la composition polymorphique entre différentes ethnies pourraient autant expliquer l'évolution pathologique d'IC que des réponses différentielles entre les traitements pharmacologiques.

1.15.5 Antiarythmiques en insuffisance cardiaque

Les patients atteints d'IC sont à risque de mort subite et ce risque proviendrait essentiellement des arythmies. Cependant, la plupart des antiarythmiques possèdent des

propriétés inotropes négatives et peuvent être proarythmiques dans cette population [65, 71]. Dans le contexte d'une dysfonction ventriculaire accompagnée d'un remodelage ventriculaire et d'une modification de l'architecture morphologique cardiaque, ces effets peuvent être très dangereux. En effet, pratiquement tous les antiarythmiques disponibles actuellement sont contre-indiqués chez les patients atteints d'IC [36, 65]. Les seules exceptions sont l'amiodarone et le dofétilide [36].

L'étude GESICA [115] fût la première étude d'envergure à démontrer que l'ajout de l'amiodarone réduit la mortalité et les hospitalisations suite à une détérioration de l'IC. Alors que l'amiodarone semblait efficace pour réduire des arythmies ventriculaires et améliorer la FEVG dans une étude subséquente [73], la mortalité de toute cause et le taux de mort subite ne furent pas améliorés. Similairement, l'essai SCD-HeFT [116] concluait que l'amiodarone n'était pas supérieure au placebo à ce qui a trait à la réduction de la mortalité chez des patients en IC. Vu la non-uniformité des résultats des études cliniques, il est prudent de dire que l'amiodarone pourrait être avantageuse chez un sous-groupe de patients en particulier, qu'elle n'apporte pas d'avantages tangibles à la plupart des patients et qu'elle peut être considérée comme sécuritaire lorsque utilisée en IC.

La fibrillation auriculaire est une arythmie assez courante chez les patients atteints d'IC. Vu que ces patients souffrent déjà d'un déclin du débit cardiaque, la perte de la contraction auriculaire caractérisant cette affection induit souvent une détérioration clinique assez brusque. De plus, le risque inhérent de la fibrillation auriculaire de se transformer en une arythmie ventriculaire beaucoup plus grave, telle une tachycardie ventriculaire ou même une fibrillation ventriculaire, impose des interventions pour la contrôler. La dofétilide est une molécule

antiarythmique efficace pour convertir et maintenir le rythme sinusal chez des patients affectés par la fibrillation auriculaire [117]. L'étude DIAMOND-CHF [74] démontra que le dofétilide réduisait significativement le risque d'hospitalisation pour l'IC et la récurrence de la fibrillation auriculaire, sans toutefois affecter la mortalité. Cependant, due au risque de torsades de pointes associées avec ce médicament, son usage n'est présentement pas recommandé chez des patients en IC, surtout chez ceux en classes III et IV de la NYHA.

Étant donné l'absence de bénéfices évidents sur la mortalité, les agents antiarythmiques ne sont pas systématiquement recommandés comme traitement adjuvant de l'IC [36]. De plus, les études cliniques évaluant les antiarythmiques en IC furent conduits lorsque l'usage des β -bloqueurs était encore très faible. Ainsi, vu l'efficacité des β -bloqueurs pour diminuer la mort subite, tout avantage supplémentaire possible des antiarythmiques dans la pratique courante risque d'être superflu. Par ailleurs, l'étude AFFIRM [118], comparant la stratégie du contrôle du rythme (cardioversion et maintien du rythme sinusal) avec la stratégie du contrôle de la fréquence cardiaque (ex. β -bloqueur), n'a pas démontré d'avantages à aucune de ces deux méthodes chez les patients en IC ou avec une FEVG diminuée. Étant donné que les β -bloqueurs font déjà parti du traitement standard de l'IC, la fibrillation auriculaire ne requiert pas d'interventions supplémentaires chez la grande majorité des patients atteints d'IC, excepté d'une anti-coagulation appropriée.

1.16 Insuffisance cardiaque avec fonction systolique préservée

L'IC avec fonction systolique préservée est aussi connue sous le nom de l'IC diastolique. Cependant, puisque les techniques d'évaluation de la fonction diastolique cardiaque sont contestables et imparfaites, le premier terme semble préférable [65]. Des données récentes situent la prévalence de l'IC avec fonction systolique préservée de 40 à 50% de tous les patients avec une IC clinique [119]. Même s'il est très difficile de distinguer une IC avec fonction préservée d'une IC avec fonction systolique détériorée en se basant sur la symptomatologie, certains indices peuvent aider à les différencier. Alors que la première semble plus prévalente chez des personnes âgées, chez les femmes et chez les patients avec des antécédents d'hypertension artérielle, la deuxième apparaît souvent suite à des conditions d'ischémie et d'IM. Nonobstant les conditions prédisposantes, la distinction s'effectue au moyen d'une échocardiographie démontrant en premier lieu une FEVG relativement normale. Toutefois, un diagnostic plus précis nécessiterait la documentation d'une relaxation ventriculaire gauche anormale. Cela est souvent déterminé avec des tests tant invasifs que non qui évaluent la relaxation du ventricule gauche, la pression intra-ventriculaire gauche, la pression capillaire pulmonaire, ainsi qu'en étudiant le flux sanguin à travers la valve mitrale par échocardiographie Doppler ou par quantification des vitesses intramyocardiques par imagerie doppler des tissus [36, 69].

On considère la diminution de la compliance ventriculaire comme un contributeur majeur à la symptomatologie clinique [120]. Même si cette condition est reconnue déjà depuis plusieurs années, la majorité des études cliniques en IC ont évalué des patients avec une fonction systolique détériorée. Ainsi, peu d'essais cliniques sont disponibles pour guider la prise en charge

d'IC avec fonction systolique préservée. Malgré cette limitation, le traitement de cette condition est basé sur le soulagement symptomatique et le contrôle des facteurs physiologiques nuisibles à la relaxation ventriculaire [121]. Or, les IECAs, les β -bloqueurs, les BRAs, les diurétiques et les bloqueurs des canaux calciques sont les classes de médicaments couramment utilisées dans cette variante d'IC.

1.17 L'avenue et la place de la génétique en insuffisance cardiaque

L'usage des IECAs, des β -bloqueurs, des BRAs et des antagonistes de l'aldostérone ont grandement contribué à l'amélioration de la qualité de vie et de la survie des patients atteints d'IC. Cependant, il semble que nous avons atteint un plateau en termes de bénéfices pouvant être retirés de l'inhibition actuelle du système neurohormonal. Afin de persévérer dans la prise en charge du traitement de l'IC, la communauté scientifique doit se réorganiser et modifier ses stratégies d'approche face à ce problème de santé grandissant. Pour y arriver, quatre tactiques semblent ressortir: 1) découverte de nouvelles molécules modulant les voies métaboliques impliquées dans la pathogenèse de l'IC, 2) l'application de thérapies de remplacement cellulaire, 3) stratégies chirurgicales et de dispositifs mécaniques, et enfin 4) la thérapie génique. Vue l'énorme quantité de recherche s'effectuant sur l'IC et les maladies cardiovasculaires en général, cette prochaine section traitera seulement du thème majeur de cette thèse, soit l'implication et le rôle de polymorphismes génétiques dans la pathophysiologie et la pharmacothérapie de l'IC.

1.18 La race existe, mais elle n'a pas d'importance

L'ethnie, la race ou l'origine natale sont tous des termes dénotant une certaine séparation ou dissemblance entre les diverses populations. Même si des différences perceptibles visuellement ou des distinctions culturelles existent entre les peuples, celles-ci deviennent largement imprécises dans le contexte de globalisation actuelle, et surtout future. Vu le multiculturalisme actuellement présent dans les pays développés et le mélange interethnique déjà entamé, il est fort probable que les générations prochaines ne pourront plus être associées à un seul groupe ethnique. En conséquence, il est d'autant vrai que les thérapies avec une connotation raciale ne pourront et ne devraient plus être applicables. Néanmoins, la revue des données épidémiologiques avec notions ethniques peut nous guider dans la compréhension des processus génétiques sous-jacents d'une pathologie comme l'IC, ainsi que dans l'application de ces processus dans les stratégies thérapeutiques futures.

Cette conscientisation est particulièrement pertinente dans l'évaluation de l'IC chez les sujets de race noire. L'IC est plus fréquente dans cette population, affectant approximativement trois pourcent de tous les individus adultes; ceci indique que l'incidence de cette pathologie est jusqu'à 50 pourcent plus grande que celle dans la population générale [122]. De plus, les patients de race noire deviennent symptomatologiques plus hâtivement et à partir du moment du diagnostic, l'IC progresse plus rapidement avec comme conséquence un plus grand nombre d'hospitalisations récurrentes [123]. Évidemment, plusieurs raisons pourraient expliquer cette divergence du processus pathologique entre les ethnies, soit l'incidence plus marquée de certains facteurs de risque comme l'hypertension artérielle ou le diabète de type 2 chez les sujets de race

noire. Par ailleurs, même si certains pourraient suggérer l'impact négatif de facteurs socioéconomique ou une inéquitabilité dans l'attribution de soins de santé, cela ne semble pas le cas [124]. Néanmoins, ce qui est clair, c'est que les minorités ethniques ont souvent été sous-représentées dans les grandes études cliniques, ce qui compromet l'extrapolation de données de celles-ci vers ces sous-groupes de population. Par contre, il semble que les patients de race noire répondraient moins bien à un traitement avec un IECA [113], qu'ils sont prédisposés à l'apparition d'un angioedème avec ceux-ci [125], qu'ils bénéficient grandement de la combinaison d'isosorbide dinitrate/hydralazine [114] et que les individus asiatiques sont plus enclin à développer une toux associée aux IECAs [126]. Du côté des β -bloqueurs, alors que le bucindolol serait assujéti à une disparité dans la réponse clinique entre les patients de race noire et ceux de race blanche [96], le carvedilol semble être aussi efficace dans ces deux populations [127].

Nous sommes donc en présence de certains indices suggérant la divergence de réponse au traitement entre diverses populations. Et même si les données actuelles ne nous permettent pas de déroger du traitement standard pour "accommoder" un sous-groupe particulier, le temps viendra où ce processus ne sera pas juste encouragé, mais obligatoire. Mais pour l'instant, avant d'y arriver, il est important d'abolir certains préjugés que nous avons érigés au cours des vingt dernières années. Le premier étant probablement le plus important et nécessite l'acceptation et la compréhension du fait que la catégorisation raciale n'est qu'un marqueur très imprécis des facteurs génétiques responsables des réponses individuelles à la pharmacologie [128]. En conséquence, une réponse thérapeutique divergente attribuée à un groupe ethnique particulier ne s'appliquera pas à tous les membres de ce groupe. Ignorer cette constatation serait de commettre une grave erreur puisque, d'un côté, certains membres d'un groupe ethnique seront traités par un traitement qui leur est inefficace ou dommageable, et de l'autre côté, des membres d'un autre

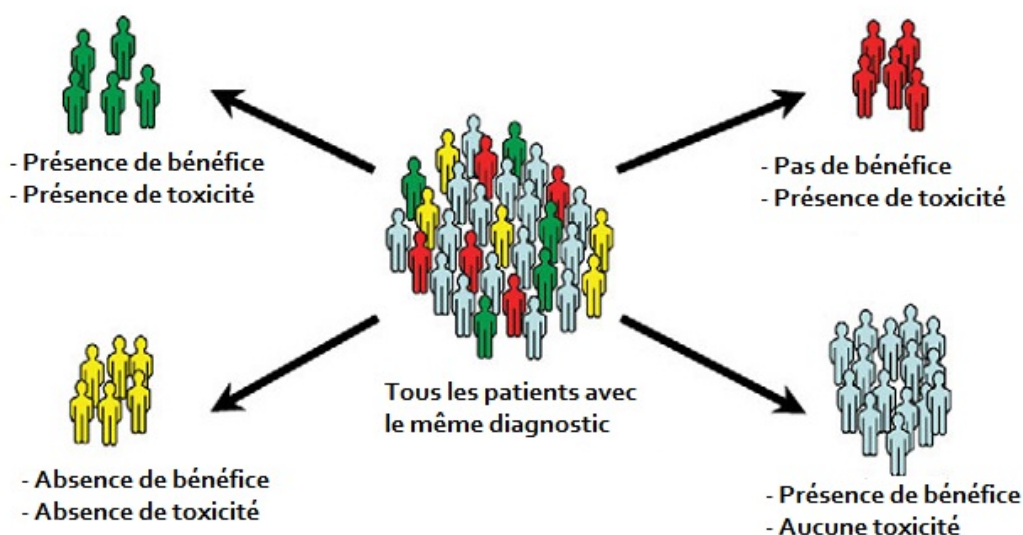
groupe ethnique seront privés d'une thérapie qui leur serait avantageuse. L'exemple parfait d'un tel scénario est l'étude A-HeFT qui était conduite spécifiquement chez les patients de race noire [114]. Plusieurs indexes de mortalité et de morbidité ont été abaissés dans cette étude par un traitement avec l'isosorbide dinitrate et l'hydralazine, ce qui mena à son arrêt prématuré. Le problème que cause une telle étude est que l'effet de cette combinaison thérapeutique dans les conditions préconisées par celle-ci n'est pas connu chez les individus des autres groupes ethniques. De plus, forcément tous les patients de race noire éligibles seront, à tort, traités par celle-ci. Pour prévenir de telles mauvaises compréhensions, il est nécessaire de reconnaître l'importance des différences individuelles, peu importe la race, dans les réponses pharmacologiques afin de permettre une approche thérapeutique personnalisée.

1.19 Implication de la génétique en insuffisance cardiaque

La reconnaissance de la portée que pourrait avoir la génétique en IC provient des observations découlant des grandes études cliniques. En fait, les grandes évidences d'une divergence pharmacothérapeutique entre diverses populations proviennent des comparaisons rétrospectives comparant la réponse au traitement entre des sujets de race blanche à ceux de race noire. La notion qui en découle est que des gens différents répondent différemment à un même produit. En poussant cette idéologie un peu plus loin, on peut constater que quatre grands groupes de patients ressortent d'un groupe débutant un traitement pharmacologique (figure 8). Donc, à part ceux qui démontrent une réponse attendue et recherchée, il y a aussi certains qui subissent des effets secondaires très graves. Des exemples spécifiques référant à ce dernier groupe peuvent être reliés aux raisons du retrait du marché des molécules comme la cérvastatine [129] et le

cisapride [130]. Cette variabilité de réponse pharmacologique est particulièrement pertinente pour des patients en IC, puisque certains de ceux-ci peuvent prendre jusqu'à neuf médicaments différents. Il serait alors très bénéfique pour ces patients si on pouvait cibler les thérapies qui leurs sont les plus avantageuses, ajuster les doses des médicaments qui le nécessitent et cesser les médicaments qui causent des problèmes actuellement ou qui pourraient potentiellement le faire dans le futur. Identifier quels traitements pharmacologiques sont les plus avantageux pour un individu en particulier pourrait réduire les réactions indésirables, diminuer le nombre de médicaments pris, diminuer les coûts et augmenter l'observance au traitement.

Figure 8: Démonstration schématique d'une divergence pharmacothérapeutique à un même produit.



Le principe de la pharmacogénomique: identifier les patients à risque de toxicité ou d'une réponse thérapeutique inadéquate pour optimiser la pharmacothérapie et/ou la posologie. (Adapté de [131])

1.20 Polymorphismes, pharmacogénétique et pharmacogénomique

En 1953, par leurs travaux sur la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN), Watson et Crick [132] ont changé la façon de voir le monde quand ils ont littéralement découvert le patron de la vie. Nous savons depuis que cette énorme molécule se trouve dans pratiquement chaque cellule de notre corps et qu'elle détient toute l'information nécessaire pour les faire fonctionner. L'aboutissement du projet du génome humain en 2003 a cependant souligné la notion qu'un même gène n'est pas contraint à une seule forme structurale et peut donc être polymorphique.

Dans sa définition la plus simple, un polymorphisme fait référence à toute chose pouvant exister dans au moins deux états différents. Dans le contexte de la génétique, le polymorphisme indique alors la présence d'au moins deux versions différentes d'un même segment d'ADN. Ces segments polymorphiques correspondants sont alors dénommés des allèles; le site physique précis dans le génome de leur emplacement quant à lui est un locus. Évidemment, de cette définition découlent certains principes qui peuvent ne pas être immédiatement évidents. Premièrement, lorsqu'on compare deux allèles, ceux-ci doivent nécessairement provenir de la même espèce. Deuxièmement, puisqu'on s'intéresse surtout à la génétique humaine et que les humains sont des espèces diploïdes, un individu ne peut détenir qu'un maximum de deux allèles distinctes. Il sera alors un homozygote pour cet allèle si les deux segments d'ADN correspondants sont identiques ou un hétérozygote lorsqu'il détient deux allèles différents. Et finalement, tout polymorphisme doit être assez fréquent dans une population pour ne pas être considéré comme

une mutation spontanée. Par convention, cette fréquence a été établie à 1% [133]. Similairement aux mutations, les polymorphismes peuvent être de diverses natures, soit des modifications d'une seule paire de bases (mononucléotide), soit des délétions d'un segment contigu et ils peuvent se retrouver dans des sections codantes ou non de l'ADN.

L'intérêt actuel pour les polymorphismes génétiques est à ses débuts et pour l'instant peut être subdivisé en trois grandes sphères médicales lorsque appliqué à un processus pathologique. Tout d'abord vient le champ de la prévention, soit la volonté de connaître si un allèle spécifique serait prédisposant à une maladie. Le but d'une telle information serait de trouver des traits génétiques pouvant identifier des individus à risque d'une pathologie spécifique, permettant ainsi l'instauration d'une thérapie préventive d'une façon précoce. Le deuxième en ligne est le champ de la progression. Celui-ci fait référence à la découverte des allèles modifiant l'évolution d'une maladie. Dans cette sphère, il s'agirait de trouver quels traits génétiques font que certains progressent plus rapidement vers des états plus avancés d'une maladie. L'information recueillie nous permettrait alors de cibler ceux qui nécessitent une thérapie plus agressive. Et le dernier champ d'intérêt est la réponse thérapeutique à un traitement médicamenteux, aussi appelée la pharmacogénétique. L'expansion des connaissances dans cette dernière servirait à relier un individu à un régime thérapeutique qui lui serait le plus bénéfique. Le sujet ainsi traité profiterait de sa thérapie plus rapidement et d'une façon plus sécuritaire, s'épargnant du processus actuel basé dans la majorité des cas d'essais-erreurs parsemés d'effets secondaires. Cette approche promet l'avènement de la médecine personnalisée dans laquelle chaque médicament ou combinaison de médicaments sont optimisés pour chaque individu et son bagage génétique. Comme nous l'avons vu précédemment, lorsqu'on exclut les cas d'IC congénitale causés par des mutations précises, la vaste majorité des ICs sont régies, aggravées ou atténuées par une panoplie

de voies métaboliques interreliées avec des processus physiologiques et pathologiques. Il serait donc très surprenant qu'un seul allèle en particulier fasse foi d'une application fructueuse de la génétique et ressoudé tous les enjeux thérapeutiques actuels dans une maladie aussi complexe que l'IC. Il serait donc plus probable que plusieurs allèles soient impliqués, contribuant chacun marginalement lorsque isolés, mais ayant un effet additionnel ou synergique lorsque considérés concomitamment. Cette notion d'interaction allélique lorsque appliquée aux études évaluant l'influence de la variation génétique sur la réponse aux médicaments se nomme la pharmacogénomique.

1.20.1 L'épigénétique

Depuis la dernière décennie, une attention particulière fut portée vers un nouveau champ d'étude qui est issu directement du domaine de la génétique, soit l'épigénétique. L'épigénétique est l'étude de la transmission héréditaire de phénotypes qui se produit au-delà des changements dans la séquence d'ADN. Les mécanismes épigénétiques sont des facteurs génomiques flexibles qui peuvent changer la fonction du génome, entre autres suite à une influence exogène. De plus, ces mécanismes peuvent aussi fournir un substrat moléculaire qui permet la propagation stable des états d'expression des gènes d'une génération de cellules vers la suivante.

Plusieurs mécanismes épigénétiques furent récemment découverts, mais celle qui est la plus connue est la méthylation de l'ADN [134]. Celle-ci est représentée par une modification covalente de la chaîne d'ADN par un groupe méthyle, et ce principalement sur les cytosines qui sont suivies des guanines. Ce genre de modification est habituellement attribué à une inactivation

génique. La méthylation de l'ADN est également soupçonné de jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome. Le deuxième mécanisme épigénétique découvert fût l'altération des histones. Les modifications d'histones peuvent être diverses et incluent, entre autres: 1) méthylation, 2) acétylation, 3) phosphorylation, 4) ubiquitination et 5) sumoylation. Ces modifications changent l'interaction qu'ont les histones avec l'ADN. Conséquemment, une activation ou une répression de transcription pourrait être induite suite à une telle altération [135]. Le troisième mécanisme épigénétique reconnu est l'existence de courtes séquences en ARN (de l'anglais: microRNA ou miRNA ou miR) qui agissent comme des régulateurs de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel [136]. La régulation de l'expression des protéines par les miRNAs est très complexe car plusieurs miRNAs différents peuvent cibler le même gène et plusieurs gènes différents peuvent être affectés par le même miRNA [136].

L'intérêt dans cette branche d'études provient du fait que, au-delà des variations en nucléotides entre divers individus, la variation épigénétique pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique et ainsi présenter un autre mécanisme pouvant expliquer des variations interindividuelles [137]. L'épigénétique semble représenter le lien critique entre le code génétique et l'expression phénotypique; un lien qui est sous une double influence, soit celle des facteurs génétiques et environnementaux.

Des données actuelles indiquent que des facteurs de risque cardiovasculaires pourraient influencer et remodeler le patron épigénétique [138]. À leur tour, les modifications épigénétiques pourraient contribuer aux maladies cardiovasculaires. L'épigénétique est intrinsèquement reliée à la génétique, puisque les modifications épigénétiques peuvent modifier l'expression des variations génétiques, de même que la variation génétique est l'un des déterminants de la

méthylation de l'ADN et des altérations des histones. Plus spécifiquement, des modèles animaux ont démontré que la méthylation d'ADN joue un rôle convaincant dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Des souris déficientes en gènes codant pour des enzymes qui induisent la méthylation, tels que la DNMT (de l'anglais: DNA methyltransférases) qui établissent et répliquent la méthylation de l'ADN ou les MTHFR (de l'anglais: methylenetetrahydrofolate reductase) qui joue un rôle dans la genèse de donneurs du groupe méthyle, démontrent de l'hypométhylation de leur ADN. Cela se traduit par une expression accrue de médiateurs d'inflammation chez celles déficientes en DNMT [139] et une formation accrue des stries lipidiques aortiques chez celles déficientes en MTHFR [140]. Chez l'homme, l'hypométhylation semble être très prévalente au niveau de cellules musculaires lisses prélevées des plaques athérosclérotiques avancées [141]. À propos des modifications touchant les histones, la trichostatine A, un inhibiteur spécifique de l'histone deacetylase, augmente significativement la formation des stries lipidiques et l'infiltration des macrophages dans des lésions athérosclérotiques dans un modèle expérimental animal [142]. Turunen et al. [143] ont même suggéré que la dérégulation de modifications épigénétiques des histones pourrait s'avérer un mécanisme sous-jacent important dans le maintien d'un phénotype pro-inflammatoire au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux chez des diabétiques.

L'épigénome, contrairement au génome, subit des changements dynamiques tout au long de la vie d'un organisme, qui pourraient entamer, contribuer à ou maintenir l'état d'une expression génique adaptative et/ou déviante. De plus, la fidélité de la méthylation de l'ADN suite aux réplifications cellulaires n'est pas parfaite et se situe dans les environs de 97-99.9% par mitose [138]. Par ailleurs, la méthylation *de novo* se produit dans les cellules somatiques adultes dans jusqu'à 3-5% de mitoses, générant des changements épigénétiques additionnels [138]. Au courant

d'une vie d'un humain, un déclin longitudinal de la méthylation de l'ADN moyenne fût rapporté par Bollati et al. [144], tandis que Bjornsson et al. [145] ont constaté à la fois des pertes et des gains d'une telle méthylation au fil du temps, selon le locus étudié. Certains changements de la méthylation de l'ADN semblent aussi être influencés par des facteurs environnementaux, tels l'exposition aux polluants ou à la fumée secondaire [138] ou même par des facteurs stressants lors d'exposition *in utero* [146].

Globalement, l'étude de modifications épigénétiques est un domaine de plus intéressants, car ceux-ci pourraient dévoiler de nouveaux mécanismes pathologiques qui pourraient aider à expliquer comment l'environnement et les habitudes de vie imposent des profils d'expression génique aberrants, ce qui peut se traduire par un risque accru d'incidents cardiovasculaires. Cependant, le domaine cardiovasculaire n'est pas aussi avancé que d'autres (ex. domaine d'oncologie) en termes de recherche reliée à l'épigénétique. Conséquemment, beaucoup de questions restent sans réponse dans l'épigénétique cardiovasculaire.

Les études touchant l'épigénétique chez l'homme sont principalement basés sur des échantillons facilement disponibles, tels les leucocytes sanguins. En raison d'un rôle établi de l'inflammation et des leucocytes dans l'athérosclérose, et par extension diverses maladies cardiovasculaires, ce type de biospécimen représente un échantillon pertinent dans le domaine cardiovasculaire. Par contre, les marqueurs épigénétiques démontrent des divergences entre les tissus provenant d'un même organisme [138]. L'ampleur à laquelle les tissus périphériques, tels que les leucocytes, reflètent les signatures épigénétiques dans des tissus cardiovasculaires devra être établie dans les recherches futures. Deuxièmement, dans quelle mesure le patron épigénétique varie en fonction de l'âge, le sexe et l'ethnicité devra aussi être abordée.

Troisièmement, il sera important de mieux comprendre le regroupement familial du patron épigénétique, soit: comprendre quelles empreintes épigénétiques sont héritables et comment. Et finalement, il s'agit aussi de déceler si les signatures épigénétiques sont des épiphénomènes, des facteurs précurseurs ou faisant seulement parti de la pathophysiologie "naturelle" sans contribution intrinsèque.

L'épigénétique est un nouveau domaine d'étude excitant procurant un potentiel incroyable pour l'avancée de la science fondamentale dans plusieurs champs pathologiques, métaboliques, cellulaires, tissulaires, pharmacologiques, pharmaceutiques et physiologiques, entre autres, et ce dans plusieurs organismes divers. L'intérêt que la communauté scientifique y porte est clairement démontré par le nombre exponentiel de publications y référant qui furent publiées depuis la dernière décennie. Cependant, même si la génétique est très liée à l'épigénétique, cette dernière devrait dorénavant être considérée comme un champ d'étude à part, et non comme une ramification de la génétique. Conséquemment, même si l'épigénétique pourrait influencer sur les portées d'études génétiques, trop peu est pour l'instant connu pour pouvoir élaborer davantage.

1.21 Types d'études génétiques possibles en insuffisance cardiaque

Présentement, afin de trouver des sites génétiques d'importance dans une maladie comme l'IC, deux types d'approches sont employés, provenant de deux écoles de pensées différentes. Celles-ci sont l'étude d'association étendue du génome (de l'anglais: genome-wide association studies) et l'étude des gènes candidats (de l'anglais: candidate gene studies).

La première, soit l'étude d'association étendue du génome, aussi connue sous le nom d'étude d'association du génome complet, est une évaluation de la variation génétique à travers un génome complet donné, conçu pour repérer des locus génétiques qui seraient en association avec un trait phénotypique donné [147]. Avec l'achèvement du projet du génome humain, ainsi qu'avec les technologies de plus en plus performantes et de moins en moins coûteuses, ce type d'étude est actuellement grandement préconisé [147]. La logique derrière une telle étude est basée sur le fait que le génome humain contient des millions de polymorphismes mononucléotides ainsi que des milliers de variations du nombre de copies de segments répétés divers à travers l'ADN, et que une ou plusieurs d'elles puissent directement ou indirectement influencer le phénotype recherché. Sinon, un ou plusieurs de ces locus pourraient être à proximité d'un polymorphisme ou mutation qui n'était pas inclus dans le scan génomique initial, permettant ainsi la localisation approximative d'un site nécessitant une évaluation plus approfondie. L'étude étendue du génome permet l'échantillonnage d'au-delà d'un demi-million de locus espacés uniformément à travers le génome de chaque participant, coiffant ainsi plusieurs régions génétiques simultanément. Le désavantage majeur de ce type d'étude provient du fait que l'analyse contient généralement 30 000 locus, ce qui nécessite un ajustement statistique pour les analyses multiples [148]. D'un côté, cet ajustement abaisse le seuil considéré comme étant statistiquement significatif, ce qui requiert, de l'autre côté, que le nombre échantillonné de participants soit très élevé. Similairement, dû à l'abaissement de ce seuil, certains sites potentiellement intéressants sont simplement, et à tort, négligés. Ce genre d'étude est plus propice aux deux premières sphères du domaine médical abordés auparavant, soit la prévention et la progression [147]. Dans ces cas, l'étude étendue du génome requiert deux groupes de participants, soit les cas (atteints d'IC) et les contrôles (non-atteints d'IC). Suite au génotypage de chaque individu, un scan informatique/statistique est effectué pour déceler des marqueurs de variabilité génétique. Si une ou plusieurs variations

génétiqes sont plus ou moins fréquentes dans le groupe des cas, celle-ci sont alors considérées comme marqueurs d'une région génomique impliquée, soit dans la prédisposition, soit dans la progression de la maladie étudiée. L'avantage primordial d'un tel procédé est l'absence de toute hypothèse préalable, ce qui pourrait aussi être considéré par certains comme un désavantage. Puisque le processus se fait tout à fait à l'aveugle, jusqu'à ce qu'un site génétique ressorte comme statistiquement significatif, certains condamnent cette méthode d'être purement statistique sans aucune contribution logique basée sur des connaissances pathophysiologiques [149]. Jusqu'à date, aucune étude de ce genre n'a été accomplie dans l'évaluation de l'IC. Cependant, suite à des résultats prometteurs dans le domaine de la dégénérescence maculaire [150], du diabète de type 2 [151], du diabète de type 1 [152], de la maladie coronarienne [152], de la maladie de Crohn [152] et de l'arthrite rhumatoïde [152], ce n'est qu'une question de temps avant qu'une telle évaluation soit effectuée.

La seconde approche est l'étude des gènes candidats, aussi dénommée l'étude des gènes cibles. Cette démarche se fait complètement à l'inverse de l'approche du génome étendu; au lieu de partir l'analyse d'un état très large et imprécis, l'examen débute à des sites spécifiques préalables, le plus souvent dans les régions codantes des gènes connus comme étant impliqués, directement ou indirectement, dans le processus pathophysiologique de la maladie étudiée [153]. La logique derrière cette approche est donc très claire; la variation phénotypique étudiée est vraisemblablement causée par une variation génétique au niveau d'un gène putatif. Comme ce type d'étude est moins dispendieux et peut être accompli relativement rapidement, elle a gagné en popularité auprès de plusieurs chercheurs. De plus, une telle étude s'applique très bien à toutes les sphères médicales mentionnées auparavant, ce qui est un avantage pour ceux travaillant en pharmacogénétique. Cependant, l'étude des gènes candidats est limitée par la quantité des

connaissances actuelles de la maladie investiguée. Ainsi, il devient pratiquement impossible d'employer cette approche à une condition dont la physiologie, la pathologie, le système moléculaire sous-jacent ou la pharmacologie ne sont pas encore bien résolus [153]. Néanmoins, au fur et à mesure que des nouveaux gènes candidats potentiels sont identifiés, soit à partir des données animales, soit à partir de nouvelles connaissances du système pathologique sous-jacent ou suite à des investigations poussées du génome étendu, ce type d'étude continuera à être fréquemment employé. Plusieurs exemples de cette approche existent en IC et ils seront abordés un peu plus loin dans cette thèse.

1.22 Sites candidats putatifs en insuffisance cardiaque

Comme l'IC est une maladie complexe dont l'évolution est guidée par plusieurs voies physiologiques, pathologiques et neurohormonales entrelacés de divers systèmes compensatoires, le nombre de gènes pouvant être considérés comme cible est très important. Il ne faut pas aussi oublier que l'IC est souvent perçue comme une conséquence ultime, ou un point d'aboutissement, de plusieurs affections cardiovasculaires, pulmonaires, rénales ou même métaboliques. Or découle la constatation que les gènes impliqués dans ces affectations puissent indirectement conduire vers l'IC et que par conséquent, ceux-ci devraient aussi être considérés comme candidats lors d'études génétiques sur l'IC. Cependant, plus il existe de facteurs faisant varier la relation de cause à effet entre un gène et un phénotype, plus le lien de causalité devient difficile à démontrer. Conséquemment, il est plus sage, du moins au début, de se concentrer sur des éléments déjà démontrés comme étant impliqués directement dans la prédisposition, la progression ou la réponse au traitement de l'IC. Vu leur importance pathophysiologique et thérapeutique dans cette

maladie, le SRAA et le système adrénergique ressortent comme cibles de prédilection pour des études de gènes candidats. Plusieurs données à ce sujet existent déjà dans la littérature et seront abordés prochainement.

1.23 La génétique du système rénine-angiotensine-aldostérone

1.23.1 Enzyme de conversion de l'angiotensine

Vu son rôle clé dans la production de l'angiotensine II, ainsi que l'accessibilité de molécules bloquant son action avec des résultats très bénéfiques en IC, l'ECA peut être considéré comme le cœur du SRAA. Le gène de cette enzyme (ACE) fut aussi le premier à être considéré comme cible pour des études génétiques et pharmacogénétiques. Dans ce contexte, le polymorphisme le plus prévalent dans la littérature est sûrement l'ACE I/D. Ce dernier est basé sur la présence (I: insertion) ou l'absence (D: délétion) d'un segment répétitif de 287 paires de bases dans l'intron 16 [154]. Les homozygotes pour l'allèle D ont des concentrations d'ECA les plus élevés alors que les homozygotes pour l'allèle I ont des concentrations les plus faibles. Les hétérozygotes, quant à eux, ont des concentrations intermédiaires de cette enzyme [155]. Ce polymorphisme serait aussi responsable d'environ 50% de la variance des taux sériques de cette enzyme [156].

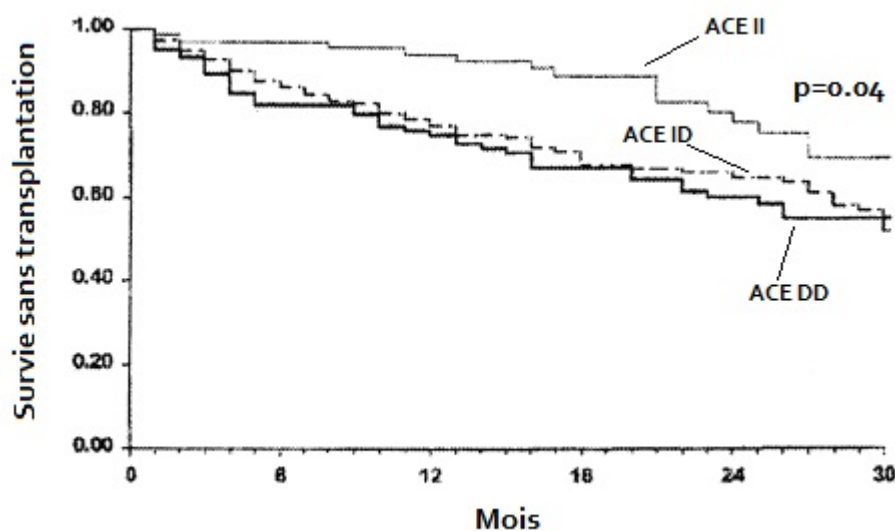
Cinq études ont évalué si ce polymorphisme modifie le risque de prédisposition à une IC de cause ischémique et/ou idiopathique [157-161]. Raynolds et al. [157] fut alors le seul à trouver

une association positive avec un risque relatif d'environ 1.5 attribuable au génotype DD. Lorsque considérés ensemble, ces études suggéraient une absence de lien entre ce polymorphisme et la prédisposition à l'IC. Cependant, il faut noter que dans les deux études auprès de la population chinoise [158, 161], la quantité de sujets avec le génotype DD fût faible; alors que dans une population caucasienne cette fréquence tourne autour d'un tiers [162], ces études reportaient une fréquence frôlant le 10%. Par conséquent, ces conclusions négatives pourraient souffrir d'une faible puissance statistique. Huang et al. [161] ont tout de même associé ce génotype avec un phénotype plus sévère d'IC, ainsi qu'avec un niveau plus élevé d'activation du SRAA. Par surcroît, les conclusions de l'étude d'Akbulut et al. [159] doivent être interprétées avec précaution. Alors qu'ils niaient une association du génotype DD avec l'IC dans leur population de Turcs, leur comparateur était des sujets atteints d'angine stable. Le problème avec le choix de leur groupe contrôle est la possibilité réelle d'erreur de classification, puisque plusieurs des patients dans ce groupe pourraient dans l'avenir souffrir d'IC; ce qui nécessiterait leur relocalisation du groupe contrôle vers le groupe "actif". Si tel était le cas, alors toutes les données présentées seraient altérés suite au changement des fréquences génotypiques évaluées. De plus, leur évaluation actuelle ne décrit pas une prédisposition à l'IC, mais plutôt le risque d'être en IC versus en angine stable lorsque seulement ces deux possibilités sont disponibles. Finalement, l'étude de Covolo et al. [160], quoique très bien structurée en apparence, comporte elle aussi plusieurs problématiques lorsque examinée plus en profondeur. Alors que les auteurs ventent leur sélection rigoureuse d'un groupe contrôle, en assurant son homogénéité ethnique et en garantissant l'absence de maladies cardiovasculaires dans celui-ci, il existe des énormes disparités dans la distribution des sexes et dans la prévalence du diabète entre les deux groupes [160]. Conséquemment, l'apparition d'erreurs de classification est aussi probable dans cette étude que dans celle d'Akbulut et al., quoique son appréciation est beaucoup plus subtile. Le point le plus

crucial se trouve à être l'inégalité des sexes entre les cas et les contrôles (10% versus 50% de femmes, respectivement) qui est soutenu par le fait que la maladie cardiovasculaire apparaît en moyenne dix ans plus tard dans la vie des femmes [163]. Or, comme les contrôles étaient appariés selon l'âge, plusieurs sujets féminins sont vraisemblablement mal classifiés.

Plusieurs données existent également dans la littérature concernant l'impact de ce polymorphisme sur l'évolution temporelle de l'IC. L'étude la plus élégante fût probablement celle démontrant une association entre le génotype DD et la progression des patients vers la transplantation [164]. Dans celle-ci, McNamara et al. ont alors démontré que la survie sans transplantation était significativement pire chez les individus porteurs de l'allèle D (pourcentage de survie sans transplantation à 1 an selon génotype II/ID/DD = 94/77/75; à 2 ans = 78/65/60, figure 9).

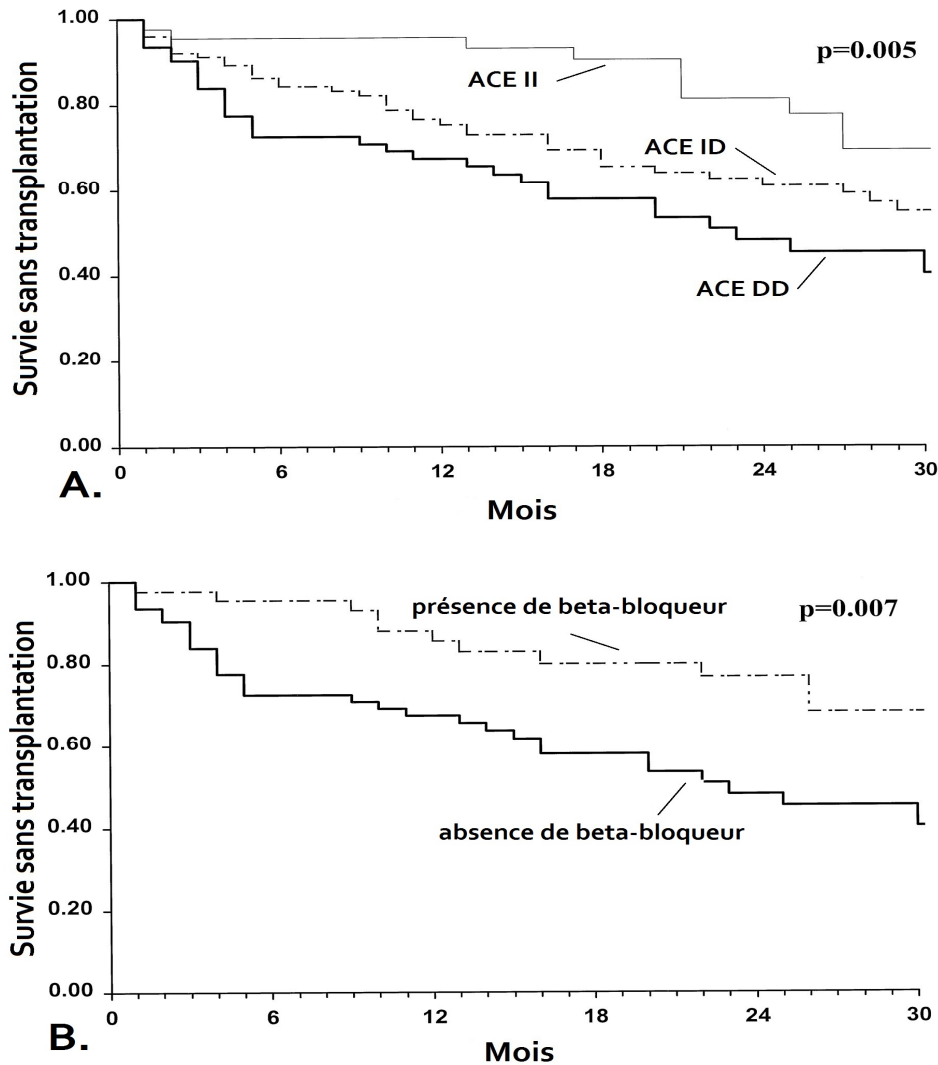
Figure 9: Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE.



p=0.04 selon le test de log-rank (groupe II vs. ID/DD), cohorte totale n=328. (Adapté de [164])

De plus, l'effet néfaste de l'allèle D était dramatiquement augmenté chez ceux ne faisant pas usage des β -bloqueurs (pourcentage de survie sans transplantation à 1 an selon le génotype II/ID/DD = 95/75/67; à 2 ans = 81/61/48, figure 10A.). Cet effet était particulièrement évident dans le groupe avec le génotype DD (figure 10B.).

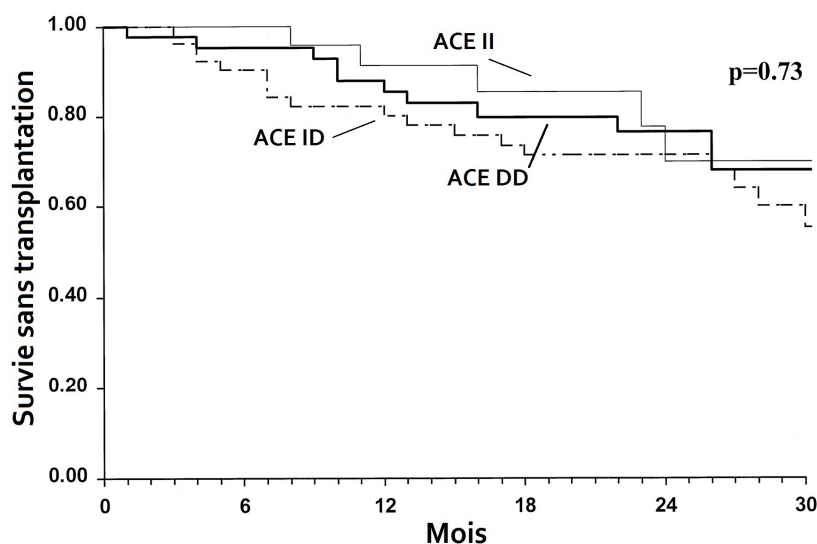
Figure 10: Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE chez des patients n'utilisant pas un bêta-bloqueur.



A. Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE chez des patients n'utilisant pas un bêta-bloqueur. $p=0.005$ selon le test de log-rank (groupe II vs. ID/DD), $n=208$. B. Survie sans transplantation selon l'usage d'un bêta-bloqueur seulement dans le groupe avec le génotype DD. $p=0.007$ selon le test de log-rank, $n=62$. (Adapté de [164])

Par contre, l'influence divergente de cet allèle sur la progression de la maladie fût totalement perdue lorsque les participants étaient sous thérapie β -bloquante (pourcentage de survie sans transplantation à 1 an selon génotype II/ID/DD = 91/80/86; à 2 ans = 70/71/77, figure 11).

Figure 11. Survie sans transplantation selon le génotype I/D du gène ACE chez des patients traités avec un bêta-bloqueur.



p=0.73 selon test de log-rank (groupe II vs. ID/DD), n=120. (Adapté de [164])

Des observations similaires ont été effectuées par Andersson et al. [165] qui démontraient que la survie à long terme des homozygotes DD est significativement écourtée. À l'inverse, Montgomery et al. [166] n'ont pas tiré les mêmes conclusions en énonçant qu'il n'y a pas d'évidences pour supporter une association avec ce polymorphisme ni avec la prédisposition ou la progression de la maladie dans leur groupe de sujets atteints d'IC idiopathique. Cependant,

jusqu'à un tiers de leurs patients étaient reconnus comme alcooliques chroniques. Cela rend la validité de leurs propos questionnable, puisqu'on est clairement en présence d'une composante environnementale alors qu'on essaye de tirer des conclusions génétiques.

1.23.2 Angiotensinogène

La deuxième composante qui est particulièrement intéressante dans le SRAA, et par extension dans l'IC, est l'angiotensinogène. Cette dernière occupe une position privilégiée dans cette voie métabolique puisqu'elle est la protéine précurseur de tout ce système. Suite à sa disponibilité, elle est clivée par la rénine pour devenir l'angiotensine I, qui à son tour subit un clivage par l'ECA pour produire l'angiotensine II. Dans ce contexte, la biodisponibilité de l'angiotensinogène serait l'étape limitant le taux de formation de l'effecteur de ce système [167].

Deux polymorphismes mononucléotides dans le gène codant pour l'angiotensinogène (gène AGT) ont été investigués en IC: le M235T et le G-6A. Le polymorphisme M235T dénote une substitution non-synonyme de la méthionine par de la thréonine au 235^{ème} acide aminé de l'angiotensinogène. Des taux augmentés de cette protéine ont été associés à l'allèle T de ce polymorphisme [168]. Quant au polymorphisme G-6A, caractérisé par une substitution d'une guanine par une adénine, celui-ci se positionne dans la zone du promoteur du gène de l'angiotensinogène. Selon des données *in vitro*, l'allèle A serait associée avec l'augmentation d'expression du gène AGT aboutissant à une plus haute synthèse de l'angiotensinogène [169].

Dans leur étude sur ces deux polymorphismes en IC, Golbergova et al. [170] n'ont démontré aucune association significative en terme de prédisposition à l'IC. Cependant, après stratification, l'allèle T235 et le génotype G-6G étaient prédominants dans le groupe IC chez les femmes. De plus, l'haplotype GGTM, provenant de la combinaison de ces deux variantes génétiques, quintuplerait leur risque pour l'IC. Curieusement, jusqu'à 20% de tous les patients en IC et jusqu'à 10% de tous les contrôles étaient porteurs de cet haplotype; alors que la fréquence de celui-ci dans la littérature est de seulement 0.004 [169]. D'ailleurs, cette fréquence est aussi abaissée dans les autres groupes ethniques, tel que 0.015 chez les japonais [169] et 0.006 chez les africain-caribéens [169].

1.23.3 Autres sites candidats au niveau du SRAA

Deux autres sites particulièrement pertinents au niveau du SRAA sont le récepteur de type 1 de l'angiotensine II et l'aldostérone synthase. Cependant, malgré l'importance pathologique de ces deux sites, peu d'intérêt d'ordre génétique leur fût porté en IC.

Le récepteur de l'angiotensine II est notamment intéressant puisque, comme cela a déjà été mentionné auparavant, la grande majorité des effets du SRAA impliquent celui-ci. Il ne faut pas non plus oublier que plusieurs études cliniques de grande envergure ont démontré que son blocage par un BRA s'avère très bénéfique pour les patients en IC. Nous démontrerons plus loin (Annexe 1) que nos travaux sont les premiers à démontrer un effet pharmacologique divergeant entre des homozygotes pour l'allèle A1166 au niveau du récepteur de l'angiotensine II et les porteurs de l'allèle C1166 suite à l'introduction d'un BRA chez des patients en IC déjà sous

traitement avec un IECA [171]. Dans cette étude pilote, même si les AA1166 présentaient une réponse beaucoup trop prononcée en termes d'abaissement de la pression systolique et diastolique tôt après l'introduction du BRA, à long terme, les porteurs du C1166 semblaient afficher une meilleure réponse clinique tel que déterminé par une plus grande suppression du taux du peptide natriurétique de type B. En outre, autres chercheurs ont aussi associée l'allèle C à un pire pronostic cardiovasculaire [172] et à l'IC diastolique [173].

L'aldostérone synthase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'aldostérone, joue un rôle important en IC puisqu'une partie du dommage causé par le SRAA passe par l'aldostérone [174]. De plus, l'antagonisme de l'aldostérone est bénéfique en terme de morbidité et de mortalité, tel que démontré dans des grandes études cliniques [106, 108]. Le gène CYP11B2, qui code pour l'aldostérone synthase, présente un site polymorphique dans son segment promoteur qui fût nettement plus investigué en IC. Il s'agit du polymorphisme C-344T qui aurait une influence modulatrice au niveau du remodelage du ventricule gauche. Les données de White et al. [175] indiqueraient que l'allèle C-344 procurerait une liaison plus forte avec le complexe de facteurs de transcription, ce qui se traduirait par une augmentation de la transcription du gène CYP11B2. Selon Tiago et al. [176], ce polymorphisme serait un facteur prédictif indépendant de l'amélioration de la FEVG. Suite à leur investigation chez des patients nouvellement diagnostiqués avec de l'IC, l'introduction d'une thérapie incluant notamment des IECAs serait plus avantageuse chez les porteurs de l'allèle C-344 qui démontrent un meilleur rétablissement de leur FEVG. McNamara et al. [177] ont obtenu des résultats complètement opposés puisque dans leur investigation, l'allèle C-344 était associé à une prépondérance d'hospitalisations et un plus grand taux de mortalité. La grande différence entre ces deux études était l'usage des β -bloqueurs, notamment leur absences dans la première [176] et leur présence dans la deuxième [177]. Comme

cela fût démontré auparavant avec le polymorphisme I/D du gène ACE, cette classe de médicament génère beaucoup de divergences lorsque vient le temps d'analyser les polymorphismes du SRAA. Il semble que cela soit encore le cas avec l'aldostérone synthase; cependant trop peu d'études se sont penchées sur ce point pour élucider le mécanisme sous-jacent expliquant cette divergence.

Le relativement simpliste concept d'un SRAA basé sur la production de l'angiotensinogène par le foie, celle de la rénine par les reins et celle de l'ECA par les poumons est maintenant dépassée suite à la graduelle découverte d'un tel système localement dans plusieurs tissus [178]. De plus, une vue élargie de ce système fait surface avec plusieurs nouvelles molécules ayant des effets physiologiques et pathologiques très pertinentes pour l'IC et la maladie cardiovasculaire en général. Ainsi, le heptapeptide angiotensine 2-8 (Ang III), dérivé de l'angiotensine II et le hexapeptide angiotensine 3-8 (Ang IV), dérivé de l'Ang III, ont tous les deux démontré une activité biologique. Pareillement, l'angiotensine 1-7 (Ang 1-7), un heptapeptide formée majoritairement par l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ECA2) semble jouer un rôle important en contrebalançant plusieurs actions de l'angiotensine II. Et finalement, des cibles moléculaires tels que le récepteur de type II de l'angiotensine, l'aminopeptidase régulée par l'insuline (de l'anglais: insulin-regulated aminopeptidase, IRAP), le récepteur *Mas* et la chymase élargissent et complexifient encore plus ce nouveau modèle du SRAA.

En plus d'être formée de l'angiotensin I par l'ECA, l'angiotensine II peut aussi être générée par la chymase. Cette dernière est stockée sous forme d'un complexe macromoléculaire dans des mastocytes [179]. La chymase devient donc active suite à sa dissociation de ce complexe

macromoléculaire lorsque ce dernier est relâché par des mastocytes, ce qui survient généralement dans des conditions de dommage vasculaire [179]. Cela signifie que la chymase produit de l'angiotensine II surtout au niveau des vaisseaux athérosclérotiques ou endommagés. Cependant, même si des résultats sur l'inhibition de la chymase dans des modèles animaux sont prometteurs [180], l'ampleur de la génération de l'angiotensine II provenant de la chymase est incertaine et les inhibiteurs de cette enzyme pouvant être utilisés chez l'homme n'ont pas encore été développés [178]. De plus, les BRAs, qui bloquent l'action de l'angiotensine II sans tenir compte de l'enzyme qui la génère, ne se sont pas avérés supérieurs aux IECAs dans des gros essais cliniques [103, 181].

Dans ce nouveau modèle, l'angiotensine II exerce son action via les récepteurs de l'angiotensine de type 1 et de type 2. Alors que ceux de type 1 engendrent des actions potentiellement néfastes en IC, ceux de type 2 semblent généralement aller à l'opposé et de promouvoir des actions bénéfiques tels que la vasodilatation, le relâchement de l'oxide nitrique, la natriurèse et l'inhibition de la prolifération et de la croissance cellulaire [178]. Cependant, les actions bénéfiques attribués au récepteur de type 2 de l'angiotensine soulèvent de la controverse car des effets potentiellement nuisibles, tels l'apoptose et l'induction de chemokines, ont également été associé à ce récepteur [182]. D'ailleurs, aucune évidence concluante n'existe pour démontrer la pertinence clinique d'une activité accrue de ce type de récepteur [103, 181].

D'un point de vue du mécanisme d'action, l'Ang III ressemble beaucoup à l'angiotensine II; elle stimule les récepteurs de l'angiotensine de type 1 et de type 2. Des données animales ont récemment démontrée que l'Ang III induit des effets équipotents en termes de portées sur la pression artérielle, la sécrétion d'aldostérone, l'excrétion de sodium et l'activité de la rénine

plasmatique [183]. Cependant, ces données ont également démontré que le taux de clairance métabolique de l'Ang III était beaucoup plus élevé que celui de l'angiotensine II. Il en ressort donc que l'effecteur principal du SRAA reste l'angiotensine II. Cependant, l'Ang III peut être clivée et générer de l'Ang IV. L'intérêt dans cette dernière a beaucoup augmenté récemment, et ce suite à la découverte des récepteurs pouvant la lier, les IRAPs [184]. Des effets de l'Ang IV passant par les IRAPs incluent, entre autre, l'expression accrue de certains médiateurs inflammatoires [185], ce qui confère à l'Ang IV un rôle plutôt nuisible au niveau du système cardiovasculaire. De plus, l'Ang IV semble réguler la croissance cellulaire des fibroblastes cardiaques, des cellules endothéliales et des cellules musculaire lisses vasculaires [185]. Comme encore trop peu de données humaines existent à son sujet dans le domaine de l'IC, le duo Ang IV-IRAP peut effectivement s'avérer une avenue de recherche très intéressante dans le futur.

Une autre molécule intéressante de ce nouveau SRAA élargi est l'Ang 1-7. Son importance fut accentuée par la relativement récente découverte de l'ECA2, une enzyme générant l'Ang 1-7 à partir de l'angiotensine II. Les effets de l'Ang 1-7 semblent contrebalancer plusieurs actions de l'angiotensine II, soit: la vasodilatation, des effets antihypertrophiques, des effets antifibrotiques et des effets antithrombotiques [186]. Ces effets résultent notamment de la liaison de l'Ang 1-7 au récepteur *Mas*. Nous sommes donc en présence d'une certaine bifurcation dans le SRAA, et ce nouveau bras ECA2 – Ang1-7 – récepteur *Mas* agit comme régulateur négatif de la voie "classique" qui aboutit en angiotensine II.

Le récepteur de la rénine complexifie davantage le SRAA. Ce type de récepteur lie à la fois la rénine et la prorénine [187]. La liaison de la prorénine servirait à accroître la transformation vers la rénine. En plus d'augmenter l'activité catalytique de la rénine, son rôle

serait d'activer des voies de signalisation intracellulaires qui mèneraient vers l'activation de certaines protéines kinases et ultimement vers une augmentation de la contractilité, l'hypertrophie et la fibrose [187]. Comme il paraît que le récepteur de la rénine participe surtout à la production locale de l'angiotensine II, son blocage pourrait s'avérer très intéressant pour la protection des tissus ou organes le plus détériorés dans le contexte d'un SRAA sur-stimulé.

1.24 La génétique du système adrénergique en insuffisance cardiaque

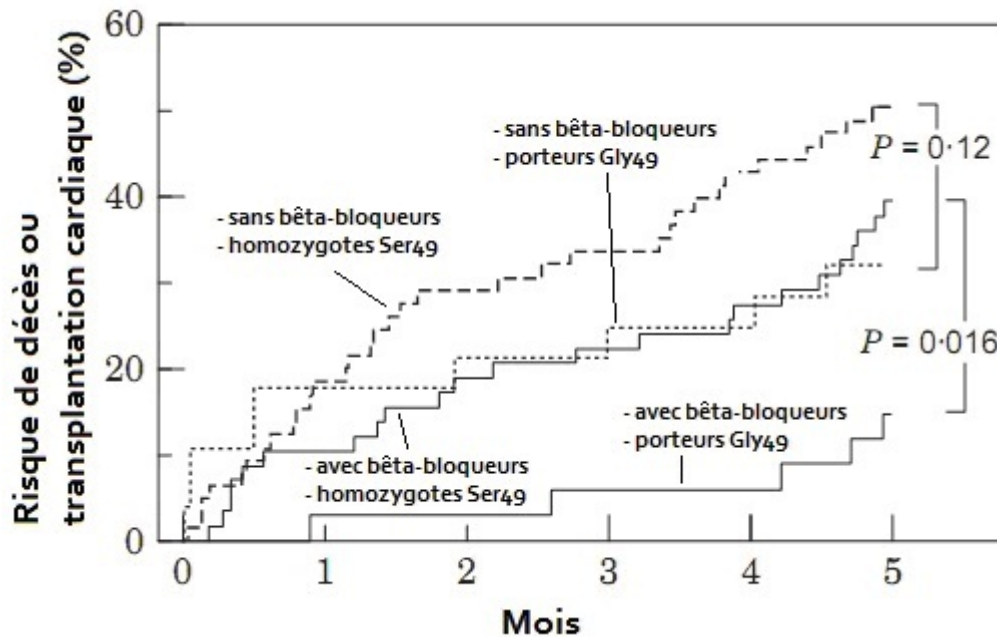
1.24.1 Récepteur bêta₁-adrénergique

Les progrès au niveau du décryptage du génome humain ont démontré que le β_1 -ADR est polymorphique. Il y a au moins deux polymorphismes mononucléotides fonctionnels d'importance dans le gène de ce récepteur. À la position 49, correspondant à une zone amino-terminale extracellulaire, une sérine est remplacée par une glycine (Ser49Gly). La variante Gly49 démontre une activité basale et une activité effectrice post-stimulation plus élevée que la variante Ser49. Par contre, suite à une activation prolongée par un agoniste, la variante Gly49 est beaucoup plus désensibilisée et se caractérise par une régulation à la baisse du récepteur beaucoup plus prononcée [188]. À la position 389, correspondant au site carboxy-terminal intracellulaire, une arginine est substituée par une glycine (Arg389Gly). Alors que durant son état basal la variante Arg389 démontre une activité légèrement augmentée, lorsque stimulée par un agoniste, cette activité est jusqu'à quatre fois plus importante que celle de son homologue Gly389 [189]. Ce phénomène serait dû à un meilleur couplage du type Arg389 à sa machinerie interne.

Malgré ces états fonctionnels différents, il ne semble pas y avoir d'association, ni avec les allèles à la position 49 [190, 191], ni avec celles à la position 389 [191-193], concernant la prédisposition à l'IC. Par contre, Small et al. [194] ont rapporté une observation particulièrement intéressante lorsqu'ils ont combiné le génotype Arg389Gly au polymorphisme de délétion de l' α_2 CADR. Évalué seul, l'allèle Arg389 n'augmentait pas le risque de prédisposition à l'IC. C'est seulement en combinaison avec cette délétion au niveau de l' α_2 CADR que l'impact de l'allèle Arg389 fut dévoilé et que ce risque devint très significatif. L'explication pour cette manifestation sera revue plus en détail dans la section 1.24.3.

Malgré tout, il existe plusieurs études évaluant l'effet de ces polymorphismes sur l'évolution de l'IC, ainsi qu'avec certains états cliniques qui y sont rattachés. Concernant la progression de l'IC, Börjesson et al. [190] ont conclu que le risque de mortalité ou de transplantation cardiaque était grandement augmenté en présence de l'allèle Ser49. De plus, cette divergence dans la progression semblait encore plus prononcée chez les utilisateurs des β -bloqueurs, suggérant que ceux-ci seraient plus efficaces chez les porteurs de l'allèle Gly49. Par ailleurs, la courbe de survie des porteurs de l'allèle Gly49 qui n'étaient pas traités avec des β -bloqueurs était presque identique à celle des Ser49 traités par des β -bloqueurs (figure 12). Ce type d'étude permet donc d'apprécier la notion de variance interindividuelle dans la réponse au traitement bêta-bloquant dans l'IC et de soutenir l'idée que les polymorphismes génétiques peuvent être des facteurs modulant cette variance.

Figure 12: Survie des patients en insuffisance cardiaque selon l'usage d'un bêta-bloqueur et le génotype Ser49Gly.



Différences entre les courbes ont été évaluées avec le test de log-rank. Pour les patients sans bêta-bloqueurs, pas de différence statistique entre les homozygotes pour Ser49 (n=63) et les porteurs de l'allèle Gly49 (n=28) (p=0.12, OR 1.79, IC95% 0.86-3.75). Pour les patients utilisant des bêta-bloqueurs, une différence statistiquement significative entre les homozygotes pour Ser49 (n=59) et les porteurs de l'allèle Gly49 (n=33) (p=0.16, OR 3.08, IC95% 1.17-8.10). (Adapté de [190])

Similairement, Magnusson et al. [195] ont souligné récemment une association du codon 49 avec le taux de survie à long-terme des patients recevant des β -bloqueurs. Chez les patients recevant de faibles doses de β -bloqueurs, la mortalité à 5 ans était significativement plus faible chez les porteurs de l'allèle Gly49. Par contre, lorsque la dose du β -bloqueur était élevée, cette divergence n'était plus présente. Il semble donc que les homozygotes pour les Ser49 bénéficient plus d'un traitement β -bloquant intensif et que les porteurs du Gly49 retirent des avantages similaires peu importe la dose. En effet, malgré des fréquences cardiaques similaires, les patients

homozygotes pour le génotype Ser49 nécessitaient des doses plus importantes que les porteurs du Gly49 [195]. Des propos similaires ont été divulgués par le groupe de Forleo et al. [196] qui, dans leur évaluation de patients avec une cardiomyopathie dilatée idiopathique, ont soutenu que les porteurs de l'allèle Gly49 avaient un risque moindre d'aggravation de leur état clinique. Cette étude n'a cependant pas relevé d'associations entre la progression de la maladie et le polymorphisme à la position 389 et le groupe de Börjesson et al. n'a même pas compilé ce génotype. Du côté du groupe de Magnusson et al. [195], le codon 389 était associé avec la survie à long-terme, avantageant les homozygotes pour le Arg389, et ce seulement chez ceux traités avec une faible dose d'un β -bloqueur.

Le deux rapports les plus connus en relation avec le codon 389 du β 1-ADR et l'IC sont probablement les analyses rétrospectives des essais MERIT-HF et BEST. Dans le premier cas, les auteurs n'ont pas rapporté d'association entre ce polymorphisme et l'issue principale de cette étude, soit la mortalité de toute cause ou une hospitalisation [197]. Effectivement, les auteurs déclarent que les fréquences alléliques et génotypiques étaient similaires entre ceux ayant subi un événement clinique de ceux ne l'ayant pas subi. Cependant, il n'est pas clair si le sous-groupe des participants qui ont accepté de participer à cette analyse génétique a été apparié pour le traitement actif de l'étude-mère, soit un β -bloqueur. De plus, *à postériori*, les sujets qui ont subi un événement clinique étaient atteints d'une IC significativement plus avancée, tel que attesté par leur pire classification de la NYHA et leur FEVG plus basse. Il semble donc y avoir trop de facteurs confondants pour qu'une conclusion claire soit émise face à l'absence d'une implication du polymorphisme Arg389Gly dans cette étude. Concernant la sous-étude génétique de l'étude BEST, alors qu'un traitement au bucindolol n'a pas procuré d'avantages au niveau de la mortalité globale dans l'étude principale, lorsque les sujets étaient génotypés pour le codon 389, seuls les

individus homozygotes pour l'allèle Arg ont retiré des bénéfices de survie et de morbidité [198]. Spécifiquement, le groupe de patients Arg389Arg traités avec le bucindolol a eu des réductions de mortalité et d'hospitalisations lorsque comparé au groupe placebo. À l'inverse, les porteurs de l'allèle Gly ont eu des résultats similaires au groupe placebo.

Certaines autres données supportent l'idée que le polymorphisme à la position 389 du β 1-ADR induit des réponses différentielles en IC. Wagoner et al. [199] ont trouvé que le pic de consommation d'oxygène pendant l'exercice était significativement plus élevé chez les ICs homozygotes pour la variante Arg389. Comme le pic de consommation d'oxygène prédit la survie des patients en IC [200], apparaît comme un paramètre clé dans l'évaluation de la sévérité d'IC et constitue un facteur décisionnel lorsque vient le temps de considérer une transplantation cardiaque [201], cette information n'est donc pas négligeable. De plus, les homozygotes pour l'allèle Arg389 semblent aussi bénéficier d'une meilleure réponse à un traitement aux β -bloqueurs. En effet, Mialet Perez et al. ont noté une amélioration significative de la FEVG chez ceux-ci suite à une utilisation à long-terme de carvedilol [202]. Terra et al. [203] ont rapporté des résultats semblables chez des patients en IC chez qui un β -bloqueur n'a pas encore été essayé. Suite à un recrutement prospectif, ils ont conclu que les homozygotes Arg389 dérivait des bénéfices plus grands en termes d'amélioration de la FEVG et de la réduction de certains paramètres échographiques. Cependant, quelques groupes de chercheurs ont rapporté des améliorations de la FEVG indépendantes du génotype 389 du β 1-ADR suite à un traitement chronique aux β -bloqueurs [197, 204].

Ces données soulèvent la possibilité que même si les patients porteurs de l'allèle Gly389 affichent des réponses à l'exercice moindres, ils bénéficient alors d'un avantage au niveau de la

survie suite à une sorte de protection contre la poussée adrénergique néfaste du système sympathique [36]. D'ailleurs, cette hypothèse englobe bien la supposition d'une meilleure réponse thérapeutique β -bloquante des homozygotes pour l'allèle Arg389. Logiquement, bloquer un récepteur sur-réactif, comme celui supposément doté de l'allèle Arg389, devrait être associé à plus de bénéfices que bloquer un récepteur déjà semi-actif. Cet état moins fonctionnel, concédé au récepteur doté de la variante Gly389, expliquerait alors son association avec la réduction de l'apparition des tachycardies ventriculaires ce qui, à son tour, amplifierait l'idée que cet allèle procure un avantage de survie suite à une certaine diminution du risque de mort subite [193].

1.24.2 Récepteur bêta₂-adrénergique

Concernant le β_2 -ADR, il existe au moins trois polymorphismes mononucléotides fonctionnels dans le gène codant pour ce récepteur: Arg16Gly, Gln27Glu et Thr164Ile [205]. *In vitro*, les propriétés fonctionnelles seraient les mêmes entre les homologues des allèles 16 et 27 [206]. Toutefois, ces polymorphismes invoquent des susceptibilités divergentes aux récepteurs en ce qui a trait à la régulation à la baisse de ceux-ci lorsque activés par des substances agonistes. Ainsi, la variante Gly16 subit un tel sort d'une façon significativement plus marquée que la variante Arg16. Et à l'opposé, la variante Glu27 semble être résistante au phénomène de régulation à la baisse du récepteur [206]. Vu leurs tendances opposées, il est alors intéressant de savoir ce qui survient lorsque ces deux variantes arrivent en même temps. En se fiant sur les données des récepteurs double-mutants Gly16Glu27, il ressort que les effets de l'allèle Gly16 dominant sur ceux de l'allèle Glu27. Après une activation par un agoniste, ces récepteurs

subissent une régulation à la baisse encore plus prononcée que les récepteurs contenant l'allèle Gln27. Par contraste, les Arg16Glu27 sont complètement résistants à une telle régulation.

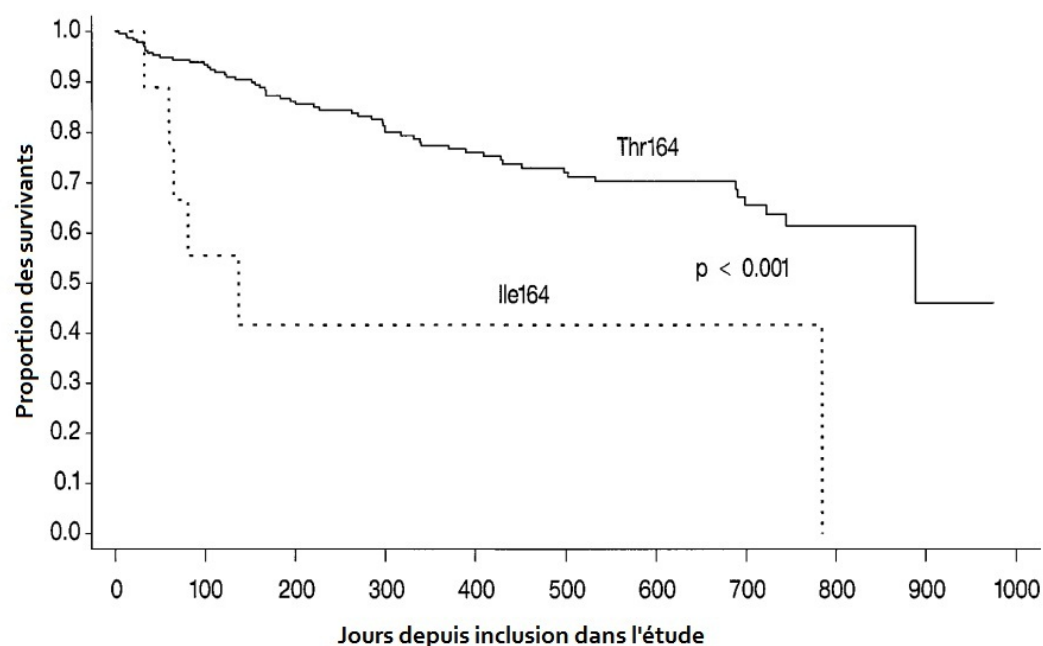
Cependant, selon les données de Xie et al. [207], les sujets homozygotes pour l'allèle Glu27 le sont pratiquement toujours aussi pour l'allèle Gly16. Il existe donc un déséquilibre de liaison entre ces deux locus et en conséquence seulement trois haplotypes des quatre combinaisons envisageables sont actuellement considérés: Gly16Glu27, Gly16Gln27 et Arg16Gln27. Par conséquent, la position 16 détermine le phénotype en ce qui a trait à la régulation à la baisse des récepteurs stimulés. De plus, certains ont aussi invoqué une composante temporelle dans ce processus où les homozygotes pour l'allèle Glu27 nécessiteraient une période beaucoup plus longue pour développer une désensibilisation perceptible [208].

Des résultats divergents ont été décrits pour ces deux variantes en IC. Forleo et al. [196] ont trouvé que les patients avec une cardiomyopathie dilatée et homozygotes pour l'allèle Glu27 (et par extension homozygotes pour l'allèle Gly16) avaient un risque d'IC beaucoup plus élevé que ceux avec l'allèle Arg16 et Gln27. D'un autre côté, trois études n'ont pas décelé d'association entre les polymorphismes du codon 16 ou 27 et l'IC dans leurs populations [191, 204, 209]. Il est intéressant de noter cependant que selon Kaye et al. [210] les patients en IC qui sont porteurs de l'allèle Glu27 répondent mieux au traitement avec un β -bloqueur que ceux avec les autres variantes.

Concernant la variante Ile164, celle-ci manifesterait des défauts de signalisation considérables. Premièrement, l'affinité de certains agonistes pour le récepteur est largement réduite en présence de ce polymorphisme. Et deuxièmement, cette variante affiche une activation

moins de son système effecteur intracellulaire, que ce soit dans son état basal de repos ou lors d'une stimulation agoniste [211]. Pourtant, encore une fois, le risque de prédisposition à l'IC ne serait pas associé à cet allèle [196, 204, 209]. Cependant, les patients avec une IC et porteurs de la variante Ile164 démontrent un pronostic moins favorable en termes de survie et de la nécessité de transplantation [209] (figure 13). Cette déclaration va de paire avec les données de Wagoner et al. [212] qui illustrent que les porteurs d'Ile164 démontraient des pics de consommation d'oxygène pendant l'exercice nettement moindres que leurs homologues homozygotes pour l'allèle Thr164.

Figure 13: Effet du polymorphisme Thr164Ile sur la survie sans transplantation des patients en insuffisance cardiaque.



$p < 0.001$ selon le test de log-rank entre les homozygotes pour Thr164 ($n=247$) et les porteurs de l'allèle Ile164 ($n=10$).
(Adapté de [209])

Vu les observations pointant vers une progression plus rapide vers la mortalité ou la transplantation cardiaque des patients porteurs de la variante Ile164, Leineweber et al. [213] ont proposé une étude très élégante en supposant que la prévalence de cette variante devrait dominer chez les patients transplantés du cœur. Les auteurs ont ensuite évalué les fréquences alléliques du codon 164 chez des patients transplantés, chez des patients en IC stable ainsi que chez des volontaires sains. Or, les fréquences relevées étaient sensiblement identiques dans les trois groupes. Même si les auteurs questionnent la pertinence de la variante Ile164 en IC, plusieurs limitations de cette étude amènent la communauté scientifique à questionner la validité de cette étude. En effet, plusieurs éléments manquants rendent les allégations des auteurs très difficiles à interpréter. Tout d'abord, le temps du début de la maladie jusqu'au moment de la transplantation n'est pas connu. Puisque la notion du temps est d'importance capitale dans l'évaluation de la progression d'une maladie, son absence dans cette étude rend l'analyse des résultats très difficiles à interpréter. Ensuite, dû à la nature rétrospective de cette étude, le nombre de patients porteurs de la variante Ile164 décédés avant le début des analyses demeure inconnu. De plus, les comparateurs, soit le groupe de volontaires sains et le groupe avec IC stable, semblent inadéquats. D'un côté, l'utilisation d'un groupe de volontaires sains évalue la prédisposition et non, comme indiqué par les auteurs, la progression. Et de l'autre côté, la progression des patients en IC stable recrutés n'est pas encore connue, ce qui invalide tout commentaire sur la progression fait à leur égard.

1.24.3 Récepteur α_2C -adrénergique

La libération de la NE des synapses sympathiques efférentes est partiellement contrôlée par un système de rétro-inhibition constitué des récepteurs α_2C présynaptiques. Un polymorphisme de délétion d'un segment de quatre acides aminés (del322-325) rend ce récepteur moins fonctionnel. L'effet net serait donc une relâche de NE accrue et soutenue, une conséquence passablement néfaste en IC. Cette hypothèse fut investiguée par le groupe de Small et al. [194]. Leur hypothèse comprenait l'évaluation de ce polymorphisme de délétion de l' α_2C ADR et la version Arg389 du β_1 -ADR, qui elle-même semble démontrer une activation augmentée. La logique serait alors que la combinaison de ces deux variantes, qui résulte en une hausse de relâche synaptique de la NE et une fonction accrue de son action sur sa cible de prédilection cardiaque, prédisposerait les individus à l'IC. Suite à leur étude, Small et al. ont remarqué que l'homozygosité pour la variante Del(322-325) augmentait considérablement le risque d'IC et qu'il n'y avait pas de risque accru attribuable à la variante Arg389 seule. Par contre, lorsque ces deux polymorphismes furent combinés, ce risque a quasiment doublé pour les homozygotes de ces deux variantes par rapport à ce qu'il était en ne considérant que la variante Del(322-325) seule. Puisque la forme Del(322-325) est assez rare chez les caucasiens, empêchant ainsi la détermination adéquate de ce risque dans cette population, cette conclusion était plutôt attribué aux patients Africains-Américains. Ayant cette étude comme modèle, Lobmeyer et al. [214] ont décidé d'évaluer si la combinaison des variantes Del(322-325)/Arg389 influence la réponse au traitement avec des β -bloqueurs chez des patients en IC. Ils ont alors remarqué que les individus porteurs de la délétion ont eu la plus grande réponse chronotrope et que ceux avec la combinaison Del(322-325)/Arg389 démontraient la plus importante augmentation de leur FEVG.

Vu une augmentation plutôt mitigée dans les autres groupes génotypiques, cette combinaison semble donc induire un effet synergique, ce qui cadre parfaitement avec le rôle physiologique de ces deux récepteurs.

Tableau 6: Résumé des polymorphismes et leurs effets sur les protéines cibles

Polymorphisme génétique	Cible moléculaire	Effet physiologique
ACE ID	ECA	allèle D: concentrations plus élevés d'ECA
AGT M235T	Angiotensinogène	allèle T: taux augmentés de l'angiotensinogène
AGT G-6A	Angiotensinogène	allèle A: augmentation d'expression du gène AGT
ATR1 A1166C	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II	allèle C: associée avec un pire pronostic cardiovasculaire
CYP11B2 C-344T	Aldostérone synthase	allèle C: liaison plus forte avec facteur de transcription
B1ADR Ser49Gly	Récepteur β_1 -adrénergique	allèle Gly: activité basale plus élevée, activité post-stimulation plus élevée, plus désensibilisé à la longue
B1ADR Arg389Gly	Récepteur β_1 -adrénergique	allèle Arg: activité basale légèrement augmentée, activité hautement augmentée post-stimulation

B2ADR Arg16Gly	Récepteur β_2 -adrénergique	allèle Gly: plus désensibilisé à la longue
B2ADR Gln27Glu	Récepteur β_2 -adrénergique	allèle Glu27: plus résistante à la désensibilisation
B2ADR Thr164Ile	Récepteur β_2 -adrénergique	allèle Ile164: activité basale et post-stimulation atténuée
A2cADR del(322-325)	récepteur α_{2c} -adrénergique	allèle de délétion: récepteur moins fonctionnel

A2cADR, récepteur α_{2c} -adrénergique; ACE, "angiotensin-converting enzyme"; AGT, angiotensinogène; ATR1, récepteur de type 1 de l'angiotensine II; B1ADR, récepteur β_1 -adrénergique; B2ADR, récepteur β_2 -adrénergique; CYP11B2; aldostérone synthase ECA; enzyme de conversion de l'angiotensine.

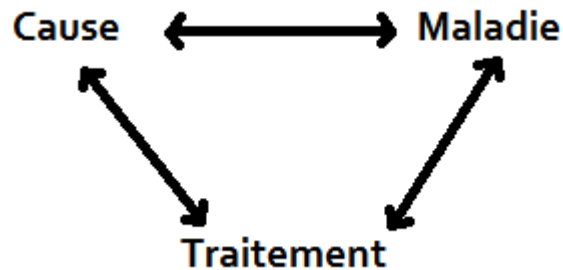
2.0 Objectifs de thèse

La découverte de la structure de la molécule d'ADN fût en effet un grand moment dans l'histoire de l'humanité. Ce qui en découla permis de comprendre le mécanisme biologique qui, on croit, contrôle la création, la croissance, l'expansion, la diversification et la multiplication tant d'un simple organisme unicellulaire que d'un être aussi complexe que l'humain. Il n'est donc pas surprenant que les études impliquant la génétique offrent beaucoup de potentiel, et ont par conséquent beaucoup de popularité. Alors que la grande majorité des avancements scientifiques impliquant cette molécule jusqu'à date se sont concentrés sur son fonctionnement, nous arrivons à un point où les recherches focalisent sur la manipulation et l'exploitation de celle-ci.

Dans un contexte prenant en compte une espérance de vie d'un humain de plus en plus longue, les nombreuses maladies chroniques qui y sont reliées, le vieillissement de la population des pays industrialisés, les coûts rattachés au système de santé, le besoin des compagnies pharmaceutiques innovatrices à trouver des molécules très performantes qui ne causent pas ou peu de tort, il appert que les études évaluant l'influence des variances génétiques dans le domaine de la médecine deviennent de plus en plus pertinentes. Parallèlement, plusieurs grandes et influentes études cliniques évaluant des traitements médicamenteux furent récemment accomplies dans le domaine de la cardiologie, et particulièrement dans l'IC. D'ailleurs, ces études ont permis de moduler et imposer des nouvelles normes dans la pratique clinique. Par conséquent, plusieurs des études évaluant l'influence des variantes génétiques en IC disponibles actuellement reposent sur des notions qui sont tirés de ces grandes études cliniques, mais que nous considérons mal-adaptés à une étude génétique. Puisque le domaine traitant des variantes génétiques est

relativement nouveau, il est nécessaire d'établir certaines notions qui, par leur implantation dans des études génétiques futures, permettront d'ériger des analyses et conclusions plus robustes.

Le pilier principal de cette thèse provient de l'idée que, dans sa représentation la plus simpliste, il existe une interrelation triangulaire entre la maladie, la cause et le traitement.



Généralement, la cause est issue de la dérégularisation ou incompétence d'une certaine protéine. Conséquemment, dans la prise en charge thérapeutique d'une maladie, le traitement vise à influencer, directement ou indirectement, cette protéine. Évidemment, cette influence est régie par des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Mais avant tout, nous voulons discuter de la relation cause-maladie, avec les variantes génétiques en avant-plan comme facteurs pouvant figurer sous la rubrique des causes. Quoique ce genre d'évaluation soit déjà reconnu dans le domaine de l'oncologie, du diabète et de certaines conditions inflammatoires, le nombre limité de données disponibles dans une maladie aussi importante que l'IC est désappointant. De plus, la plupart des études qui se font dans ce domaine ne traitent que d'une ou de deux variantes génétiques d'un ou de deux gènes candidats d'une façon concomitante, alors que la logique stipule que dans une maladie multifactorielle plusieurs gènes seraient impliqués dans le processus de la maladie. La première étude présentée vise ainsi le premier objectif général de cette thèse, soit de fournir des informations additionnelles sur des éléments de génétique reliés à l'IC avec une emphase sur l'appréciation des variantes génétiques comme facteurs de risque de l'IC.

Objectif #1: Rehausser la quantité de données scientifiques traitant des variantes génétiques en insuffisance cardiaque.

Cet objectif est composé des objectifs spécifiques suivants:

#1: Compiler des fréquences génétiques de polymorphismes mononucléotides de plusieurs gènes candidats impliqués dans la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque chez des sujets de jeune âge et des sujets atteints d'insuffisance cardiaque stable, et ce dans une population caucasienne de descendance française.

#2: Effectuer une étude de prédisposition à l'insuffisance cardiaque dans une population caucasienne de descendance française.

#3: Incorporer et apprécier la notion d'interaction gène-gène des variances génétiques dans une étude de prédisposition à l'IC.

#4: Apprécier l'importance d'évaluer les variances génétiques de plusieurs gènes candidats impliqués dans une voie métabolique ou neurohormonale lors d'études génétiques plutôt que de cibler un polymorphisme en particulier.

En médecine, il existe un sage et vieux proverbe pouvant s'appliquer à la majorité des besoins médicaux actuels de notre société, soit "il est mieux de prévenir que de guérir". La recherche et l'évaluation de variantes génétiques pouvant moduler l'apparition d'une maladie est donc capitale. Dans cette optique, la première étude abordée dans cette thèse permet l'appréciation des variances génétiques comme facteurs de risque de l'IC. Par contre, la problématique majeure survenant lors de l'évaluation des variantes génétiques comme facteurs de risque de l'IC est l'aspect multifactoriel de cette maladie. Ainsi, en plus de toutes les conditions pouvant mener directement vers l'IC, comme l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde,

il est aussi important d'être sensible aux facteurs de risque de ces conditions "intermédiaires", alors considérés comme des facteurs de risque "indirects". De plus, comme dans la plupart des cas l'IC est considéré comme une maladie affectant plutôt des personnes d'un âge avancé, l'évaluation doit aussi se pencher sur des notions de pénétrance longitudinale des ces variantes génétiques. La deuxième étude présentée dans cette thèse discute de l'évaluation d'une variante génétique comme facteur prédisposant à un IM, qui lui-même est un important facteur de risque de l'IC.

Objectif #2: Discuter de certaines notions d'importance applicables aux études génétiques évaluant des variances génétiques comme facteurs prédisposant pour une maladie multifactorielle.

Cet objectif est composé des objectifs spécifiques suivants:

#1: Discuter de la notion de pénétrance conditionnelle d'une variante génétique.

#2: Discuter de la notion du temps, en termes d'âge des sujets évalués, et ce en relation avec la pénétrance conditionnelle d'une variante génétique.

#3: Discuter de la pertinence d'évaluer un facteur de risque génétique d'un facteur de risque.

Le concept primordial découlant de cette étude est qu'un facteur de risque génétique qui n'a pas une pénétrance de 100% pour une maladie (ici IM) devient de moins en moins détectable avec le temps. Concomitamment, cette étude fournit le contraste nécessaire à la première étude et l'objectif général #1 qui y est attaché, soit qu'un facteur de risque pour une maladie "intermédiaire" (IM) devient très difficilement repérable lorsque évalué lors d'une maladie finale (IC).

Outre les résultats et les conclusions évoqués dans les deux premières études abordées dans cette thèse, nous voulons aussi souligner l'application de certains concepts importants permettant une meilleure incorporation de la génétique dans des études clinique futures. Le premier concept, soit l'utilisation d'un groupe contrôle non-apparié pour l'âge, figure dans nos deux études. Le deuxième concept, soit la bonification de l'ajout d'un deuxième groupe contrôle pour créer un contraste additionnel, est abordée uniquement dans la seconde étude.

Comme mentionné précédemment, notre discussion de l'impact de certaines variantes génétiques comme facteurs prédisposant à une maladie "intermédiaire" et une maladie "terminale" traitait de la relation cause-maladie. Pour faire suite, dans la troisième étude présentée dans cette thèse, nous voulons aborder un second aspect de cette interrelation, soit celui du traitement-cause. Cette troisième étude évalue donc l'impact de variantes génétiques comme facteurs modulateur d'une réponse au traitement de cette maladie "terminale". Présentement, seulement trois β -bloqueurs sont indiqués dans le traitement de l'IC. De ces trois molécules, seulement deux sont disponibles au Canada, puisque seule la forme tartrate de métoprolol est commercialisée, et suite aux données de l'étude COMET, elle ne devrait plus être employée dans cette condition. D'ailleurs, cette même étude fût la seule à octroyer une supériorité du carvedilol dans une comparaison directe contre un autre β -bloqueur. Conséquemment, le carvedilol devient un choix de prédilection dans le traitement de l'IC. Le troisième et dernier objectif de cette thèse est donc d'évaluer si certaines variations génétiques putatives de la pharmacologie de ce médicament affectent ses effets pharmacologiques.

Objectif #3: Évaluer l'influence de variantes dans des gènes candidats de la pharmacologie du carvédilol dans une population de patients atteints d'IC stable.

Cet objectif est composé des objectifs spécifiques suivants:

#1:Évaluer l'influence de certaines variantes génétique des gènes codant pour les cibles du carvédilol sur la réponse hémodynamique de celui-ci.

#2:Évaluer l'influence de certaines variantes génétiques de l'enzyme majoritairement responsable du métabolisme du carvédilol sur la pharmacocinétique de celui-ci.

REFERENCES

1. AHA: Heart Disease and Stroke Statistics—2005 Update. American Heart Association 2005.
2. Kannel WB, Belanger AJ: Epidemiology of heart failure. *Am Heart J* 1991; 121(3 Pt 1): 951-7.
3. O'Connell JB, Bristow MR: Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13(4): S107-12.
4. Mann DL, Bristow MR: Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 2005; 111(21): 2837-49.
5. Delgado RM, 3rd, Willerson JT: Pathophysiology of heart failure: a look at the future. *Tex Heart Inst J* 1999; 26(1): 28-33.
6. Schrier RW, Abraham WT: Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* 1999; 341(8): 577-85.
7. Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P: Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* 1997; 95(1): 169-75.
8. Thomas JA, Marks BH: Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1978; 41(2): 233-43.
9. Cohn JN: Plasma norepinephrine and mortality. *Clin Cardiol* 1995; 18(3 Suppl I): I9-12.
10. Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, Hoffman BB: Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 247(3): 1039-45.
11. Stiles GL, Taylor S, Lefkowitz RJ: Human cardiac beta-adrenergic receptors: subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. *Life Sci* 1983; 33(5): 467-73.

12. Jakob H, Nawrath H, Rupp J: Adrenoceptor-mediated changes of action potential and force of contraction in human isolated ventricular heart muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 94(2): 584-90.
13. Jahnel U, Jakob H, Nawrath H: Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992; 346(1): 82-7.
14. Brodde OE, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 1999; 51(4): 651-90.
15. Brodde OE: Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 203-42.
16. Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper Gt: Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992; 85(2): 790-804.
17. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmsen L: Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82(5): 1730-6.
18. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Macclouf J, Tedgui A: Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998; 97(16): 1536-9.
19. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P: Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94(12): 1543-53.
20. Choudhary G, Dudley SC, Jr.: Heart failure, oxidative stress, and ion channel modulation. *Congest Heart Fail* 2002; 8(3): 148-55.
21. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL: Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 1996; 2(3): 243-9.

- 22.** Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S: Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998; 98(2): 149-56.
- 23.** Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL: Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(5): 1201-6.
- 24.** Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327(10): 685-91.
- 25.** Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, et al.: Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93(4): 704-11.
- 26.** Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, et al.: Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 102(25): 3060-7.
- 27.** Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damas JK, Yndestad A: Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med* 2005; 37(2): 74-85.
- 28.** Oghlakian G, Klapholz M: Vasopressin and vasopressin receptor antagonists in heart failure. *Cardiol Rev* 2009; 17(1): 10-5.
- 29.** Goldsmith SR: Congestive heart failure: potential role of arginine vasopressin antagonists in the therapy of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002; 8(5): 251-6.
- 30.** Udelson JE, McGrew FA, Flores E, et al.: Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of oral tolvaptan on left ventricular dilation and function in patients with heart failure and systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(22): 2151-9.

- 31.** Konstam MA, Gheorghiade M, Burnett JC, Jr., et al.: Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure: the EVEREST Outcome Trial. *JAMA* 2007; 297(12): 1319-31.
- 32.** Bhalla V, Willis S, Maisel AS: B-type natriuretic peptide: the level and the drug--partners in the diagnosis of congestive heart failure. *Congest Heart Fail* 2004; 10(1 Suppl 1): 3-27.
- 33.** Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM: Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355(9210): 1126-30.
- 34.** Weinfeld MS, Chertow GM, Stevenson LW: Aggravated renal dysfunction during intensive therapy for advanced chronic heart failure. *Am Heart J* 1999; 138(2 Pt 1): 285-90.
- 35.** Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, et al.: Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 246-53.
- 36.** Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al.: 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009; 119(14): e391-479.
- 37.** Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, et al.: Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93(6): 1087-94.
- 38.** Shinke T, Takaoka H, Takeuchi M, et al.: Nitric oxide spares myocardial oxygen consumption through attenuation of contractile response to beta-adrenergic stimulation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101(16): 1925-30.

39. Steinfath M, Lavicky J, Schmitz W, Scholz H, Doring V, Kalmar P: Regional distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the failing and nonfailing human heart. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42(6): 607-11.
40. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, et al.: Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990; 82(2 Suppl): I12-25.
41. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R: Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 1989; 35(3): 295-303.
42. Bohm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, Erdmann E: Alpha-adrenoceptors and alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in failing human myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(3): 357-64.
43. Colucci WS, Braunwald E: *Atlas of Heart Failure: Cardiac Function and Dysfunction*, 2nd ed. Philadelphia: Current Medicine, 1999.
44. Kajstura J, Zhang X, Reiss K, et al.: Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res* 1994; 74(3): 383-400.
45. Grajek S, Lesiak M, Pyda M, Zajac M, Paradowski S, Kaczmarek E: Hypertrophy or hyperplasia in cardiac muscle. Post-mortem human morphometric study. *Eur Heart J* 1993; 14(1): 40-7.
46. Ferrans VJ: Morphology of the heart in hypertrophy. *Hosp Pract (Off Ed)* 1983; 18(7): 67-78.
47. Jugdutt BI: Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003; 108(11): 1395-403.
48. Camelliti P, Borg TK, Kohl P: Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005; 65(1): 40-51.

- 49.** Jugdutt BI: Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3(1): 1-30.
- 50.** Swynghedauw B: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79(1): 215-62.
- 51.** Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N: Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(3): 569-82.
- 52.** Weber KT: Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 2004; 22(1): 47-50.
- 53.** Weber KT: Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 1997; 96(11): 4065-82.
- 54.** Mann DL, Spinale FG: Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* 1998; 98(17): 1699-702.
- 55.** Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK: The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275(20): 1557-62.
- 56.** Baker DW: Prevention of heart failure. *J Card Fail* 2002; 8(5): 333-46.
- 57.** Vakili BA, Okin PM, Devereux RB: Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 2001; 141(3): 334-41.
- 58.** Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al.: ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International

Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005; 112(12): e154-235.

59. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, et al.: Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347(5): 305-13.

60. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK: Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med* 2001; 161(7): 996-1002.

61. Shindler DM, Kostis JB, Yusuf S, et al.: Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Trials and Registry. *Am J Cardiol* 1996; 77(11): 1017-20.

62. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD: The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; 329(20): 1456-62.

63. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342(3): 145-53.

64. Tota-Maharaj R, Defilippis AP, Blumenthal RS, Blaha MJ: A practical approach to the metabolic syndrome: review of current concepts and management. *Curr Opin Cardiol* 2010; 25(5): 502-12.

65. Arnold JM, Liu P, Demers C, et al.: Canadian Cardiovascular Society consensus conference recommendations on heart failure 2006: diagnosis and management. *Can J Cardiol* 2006; 22(1): 23-45.

66. Mancini DM, Walter G, Reichek N, et al.: Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* 1992; 85(4): 1364-73.

67. McDonald CD, Burch GE, Walsh JJ: Prolonged bed rest in the treatment of idiopathic cardiomyopathy. *Am J Med* 1972; 52(1): 41-50.
68. McKelvie RS, Teo KK, McCartney N, Humen D, Montague T, Yusuf S: Effects of exercise training in patients with congestive heart failure: a critical review. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(3): 789-96.
69. Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, et al.: HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail* 2010; 16(6): e1-194.
70. McAlister FA, Stewart S, Ferrua S, McMurray JJ: Multidisciplinary strategies for the management of heart failure patients at high risk for admission: a systematic review of randomized trials. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(4): 810-9.
71. Pratt CM, Eaton T, Francis M, et al.: The inverse relationship between baseline left ventricular ejection fraction and outcome of antiarrhythmic therapy: a dangerous imbalance in the risk-benefit ratio. *Am Heart J* 1989; 118(3): 433-40.
72. Pratt CM, Camm AJ, Cooper W, et al.: Mortality in the Survival With ORal D-sotalol (SWORD) trial: why did patients die? *Am J Cardiol* 1998; 81(7): 869-76.
73. Singh SN, Fletcher RD, Fisher SG, et al.: Amiodarone in patients with congestive heart failure and asymptomatic ventricular arrhythmia. Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* 1995; 333(2): 77-82.
74. Torp-Pedersen C, Moller M, Bloch-Thomsen PE, et al.: Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality on Dofetilide Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341(12): 857-65.
75. Packer M, Kessler PD, Lee WH: Calcium-channel blockade in the management of severe chronic congestive heart failure: a bridge too far. *Circulation* 1987; 75(6 Pt 2): V56-64.
76. Elkayam U: Calcium channel blockers in heart failure. *Cardiology* 1998; 89 Suppl 1: 38-46.

77. Herchuelz A, Derenne F, Deger F, et al.: Interaction between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and loop diuretics: modulation by sodium balance. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248(3): 1175-81.
78. Gottlieb SS, Robinson S, Krichten CM, Fisher ML: Renal response to indomethacin in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1992; 70(9): 890-3.
79. Teo KK, Yusuf S, Pfeffer M, et al.: Effects of long-term treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors in the presence or absence of aspirin: a systematic review. *Lancet* 2002; 360(9339): 1037-43.
80. Parker JO: The effects of oral ibopamine in patients with mild heart failure--a double blind placebo controlled comparison to furosemide. The Ibopamine Study Group. *Int J Cardiol* 1993; 40(3): 221-7.
81. Wilson JR, Reichel N, Dunkman WB, Goldberg S: Effect of diuresis on the performance of the failing left ventricle in man. *Am J Med* 1981; 70(2): 234-9.
82. Brown NJ, Ryder D, Gainer JV, Morrow JD, Nadeau J: Differential effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the vasodepressor and prostacyclin responses to bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279(2): 703-12.
83. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ: Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med* 1998; 339(18): 1285-92.
84. Garg R, Yusuf S: Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA* 1995; 273(18): 1450-6.

- 85.** Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al.: Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327(10): 669-77.
- 86.** Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, et al.: A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333(25): 1670-6.
- 87.** Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 1987; 316(23): 1429-35.
- 88.** Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, et al.: A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325(5): 303-10.
- 89.** Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K, et al.: Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet* 1993; 342(8885): 1441-6.
- 90.** Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353(9169): 2001-7.
- 91.** The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353(9146): 9-13.
- 92.** Packer M, Bristow MR, Cohn JN, et al.: The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334(21): 1349-55.
- 93.** Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, et al.: Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. *JAMA* 2003; 289(6): 712-8.

- 94.** Dargie HJ: Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet* 2001; 357(9266): 1385-90.
- 95.** Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, et al.: Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362(9377): 7-13.
- 96.** A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344(22): 1659-67.
- 97.** Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A: Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990; 265(36): 22348-57.
- 98.** Pitt B, Segal R, Martinez FA, et al.: Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 1997; 349(9054): 747-52.
- 99.** Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, et al.: Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 2003; 362(9386): 772-6.
- 100.** Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al.: Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003; 349(20): 1893-906.
- 101.** Cohn JN, Tognoni G: A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345(23): 1667-75.
- 102.** Wong M, Staszewsky L, Latini R, et al.: Valsartan benefits left ventricular structure and function in heart failure: Val-HeFT echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(5): 970-5.

- 103.** Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, et al.: Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 2000; 355(9215): 1582-7.
- 104.** McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, et al.: Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 2003; 362(9386): 767-71.
- 105.** Struthers AD: Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail* 1996; 2(1): 47-54.
- 106.** Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al.: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341(10): 709-17.
- 107.** Craft J: Eplerenone (Inspra), a new aldosterone antagonist for the treatment of systemic hypertension and heart failure. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2004; 17(2): 217-20.
- 108.** Pitt B, Remme W, Zannad F, et al.: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348(14): 1309-21.
- 109.** Zannad F, McMurray JJ, Drexler H, et al.: Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Eur J Heart Fail* 2010; 12(6): 617-22.
- 110.** Elkayam U, Johnson JV, Shotan A, et al.: Double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of organic nitrates in patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 1999; 99(20): 2652-7.

- 111.** Gogia H, Mehra A, Parikh S, et al.: Prevention of tolerance to hemodynamic effects of nitrates with concomitant use of hydralazine in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(7): 1575-80.
- 112.** Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, et al.: Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1986; 314(24): 1547-52.
- 113.** Carson P, Ziesche S, Johnson G, Cohn JN: Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. Vasodilator-Heart Failure Trial Study Group. *J Card Fail* 1999; 5(3): 178-87.
- 114.** Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, et al.: Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med* 2004; 351(20): 2049-57.
- 115.** Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Perrone SV, Bortman GR, Curiel R: Randomised trial of low-dose amiodarone in severe congestive heart failure. Grupo de Estudio de la Sobrevida en la Insuficiencia Cardíaca en Argentina (GESICA). *Lancet* 1994; 344(8921): 493-8.
- 116.** Stevenson WG, Stevenson LW, Middlekauff HR, Saxon LA: Sudden death prevention in patients with advanced ventricular dysfunction. *Circulation* 1993; 88(6): 2953-61.
- 117.** Lenz TL, Hilleman DE: Dofetilide: A new antiarrhythmic agent approved for conversion and/or maintenance of atrial fibrillation/atrial flutter. *Drugs Today (Barc)* 2000; 36(11): 759-71.
- 118.** Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, et al.: A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002; 347(23): 1825-33.
- 119.** Owan TE, Redfield MM: Epidemiology of diastolic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; 47(5): 320-32.

- 120.** Zile MR, Brutsaert DL: New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* 2002; 105(11): 1387-93.
- 121.** Litwin SE, Grossman W: Diastolic dysfunction as a cause of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(4 Suppl A): 49A-55A.
- 122.** Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Cooper HA, Carson PE, Domanski MJ: Racial differences in the outcome of left ventricular dysfunction. *N Engl J Med* 1999; 340(8): 609-16.
- 123.** Alexander M, Grumbach K, Remy L, Rowell R, Massie BM: Congestive heart failure hospitalizations and survival in California: patterns according to race/ethnicity. *Am Heart J* 1999; 137(5): 919-27.
- 124.** Rathore SS, Foody JM, Wang Y, et al.: Race, quality of care, and outcomes of elderly patients hospitalized with heart failure. *JAMA* 2003; 289(19): 2517-24.
- 125.** McDowell SE, Coleman JJ, Ferner RE: Systematic review and meta-analysis of ethnic differences in risks of adverse reactions to drugs used in cardiovascular medicine. *BMJ* 2006; 332(7551): 1177-81.
- 126.** Tseng DS, Kwong J, Rezvani F, Coates AO: Angiotensin-converting enzyme-related cough among Chinese-Americans. *Am J Med*; 123(2): 183 e11-5.
- 127.** Yancy CW, Fowler MB, Colucci WS, et al.: Race and the response to adrenergic blockade with carvedilol in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344(18): 1358-65.
- 128.** Collins FS: What we do and don't know about 'race', 'ethnicity', genetics and health at the dawn of the genome era. *Nat Genet* 2004; 36(11 Suppl): S13-5.
- 129.** Bolego C, Baetta R, Bellosta S, Corsini A, Paoletti R: Safety considerations for statins. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(6): 637-44.

- 130.** Napolitano C, Schwartz PJ, Brown AM, et al.: Evidence for a cardiac ion channel mutation underlying drug-induced QT prolongation and life-threatening arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; 11(6): 691-6.
- 131.** Marsh S, McLeod HL: Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. *Hum Mol Genet* 2006; 15 Spec No 1: R89-93.
- 132.** Watson JD, Crick FH: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171(4356): 737-8.
- 133.** Twyman R: Mutation or polymorphism? : The Human Genome, 2003; web page. [http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html] [cited 20 november 2010].
- 134.** Feinberg AP: Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 2008; 299(11): 1345-50.
- 135.** Mano H: Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure. *Environ Health Prev Med* 2008; 13(1): 25-9.
- 136.** Schroen B, Heymans S: MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures. *Hypertension* 2009; 54(6): 1189-94.
- 137.** Dennis C: Epigenetics and disease: Altered states. *Nature* 2003; 421(6924): 686-8.
- 138.** Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ: Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3(6): 567-73.
- 139.** Makar KW, Wilson CB: DNA methylation is a nonredundant repressor of the Th2 effector program. *J Immunol* 2004; 173(7): 4402-6.
- 140.** Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al.: Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001; 10(5): 433-43.

- 141.** Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, et al.: DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 2002; 7(1): 5-11.
- 142.** Choi JH, Nam KH, Kim J, et al.: Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(11): 2404-9.
- 143.** Turunen MP, Aavik E, Yla-Herttuala S: Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(9): 886-91.
- 144.** Bollati V, Schwartz J, Wright R, et al.: Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(4): 234-9.
- 145.** Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, et al.: Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008; 299(24): 2877-83.
- 146.** Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, et al.: DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009; 18(21): 4046-53.
- 147.** Manolio TA: Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363(2): 166-76.
- 148.** Pearson TA, Manolio TA: How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008; 299(11): 1335-44.
- 149.** Hunter DJ, Altshuler D, Rader DJ: From Darwin's finches to canaries in the coal mine--mining the genome for new biology. *N Engl J Med* 2008; 358(26): 2760-3.
- 150.** Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al.: Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308(5720): 385-9.
- 151.** Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al.: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445(7130): 881-5.

- 152.** Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145): 661-78.
- 153.** Kwon JM, Goate AM: The candidate gene approach. *Alcohol Res Health* 2000; 24(3): 164-8.
- 154.** Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20(6): 1433.
- 155.** Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al.: Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51(1): 197-205.
- 156.** Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1343-6.
- 157.** Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, et al.: Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342(8879): 1073-5.
- 158.** Sanderson JE, Young RP, Yu CM, Chan S, Critchley JA, Woo KS: Lack of association between insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and end-stage heart failure due to ischemic or idiopathic dilate cardiomyopathy in the Chinese. *Am J Cardiol* 1996; 77(11): 1008-10.
- 159.** Akbulut T, Bilsel T, Terzi S, et al.: Relationship between ACE gene polymorphism and ischemic chronic heart failure in Turkish population. *Eur J Med Res* 2003; 8(6): 247-53.
- 160.** Covolo L, Gelatti U, Metra M, et al.: Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and heart failure: a case-control study. *Biomarkers* 2003; 8(5): 429-36.

- 161.** Huang W, Xie C, Zhou H, Yang T, Sun M: Association of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with chronic heart failure in Chinese Han patients. *Eur J Heart Fail* 2004; 6(1): 23-7.
- 162.** Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dube MP, Belanger F, White M, Turgeon J: Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65(5): 742-51.
- 163.** Bello N, Mosca L: Epidemiology of coronary heart disease in women. *Prog Cardiovasc Dis* 2004; 46(4): 287-95.
- 164.** McNamara DM, Holubkov R, Janosko K, et al.: Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2001; 103(12): 1644-8.
- 165.** Andersson B, Sylven C: The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(1): 162-7.
- 166.** Montgomery HE, Keeling PJ, Goldman JH, Humphries SE, Talmud PJ, McKenna WJ: Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(7): 1627-31.
- 167.** Gould AB, Green D: Kinetics of the human renin and human substrate reaction. *Cardiovasc Res* 1971; 5(1): 86-9.
- 168.** Danser AH, Derkx FH, Hense HW, Jeunemaitre X, Riegger GA, Schunkert H: Angiotensinogen (M235T) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphisms in association with plasma renin and prorenin levels. *J Hypertens* 1998; 16(12 Pt 2): 1879-83.

- 169.** Inoue I, Nakajima T, Williams CS, et al.: A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99(7): 1786-97.
- 170.** Goldbergova M, Spinarova L, Spinar J, Toman J, Vasku A, Vacha J: Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G(-6)A, with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2003; 89(2-3): 267-72.
- 171.** de Denus S, Zakrzewski-Jakubiak M, Dube MP, et al.: Effects of AGTR1 A1166C gene polymorphism in patients with heart failure treated with candesartan. *Ann Pharmacother* 2008; 42(7): 925-32.
- 172.** Miller JA, Scholey JW: The impact of renin-angiotensin system polymorphisms on physiological and pathophysiological processes in humans. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13(1): 101-6.
- 173.** Wu CK, Tsai CT, Chang YC, et al.: Genetic polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and diastolic heart failure. *J Hypertens* 2009; 27(3): 502-7.
- 174.** Briet M, Schiffrin EL: Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*; 6(5): 261-73.
- 175.** White PC, Slutsker L: Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 1995; 21(1-2): 437-42.
- 176.** Tiago AD, Badenhorst D, Skudicky D, et al.: An aldosterone synthase gene variant is associated with improvement in left ventricular ejection fraction in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2002; 54(3): 584-9.
- 177.** McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, et al.: Aldosterone synthase promoter polymorphism predicts outcome in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT Trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(6): 1277-82.

- 178.** Fyhrquist F, Saijonmaa O: Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264(3): 224-36.
- 179.** Takai S, Jin D, Muramatsu M, Miyazaki M: Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(10): 518-22.
- 180.** Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M: Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* 2006; 112(3): 668-76.
- 181.** Dickstein K, Kjeksus J: Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. Lancet* 2002; 360(9335): 752-60.
- 182.** Carey RM: Update on the role of the AT₂ receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(1): 67-71.
- 183.** Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P: Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 188(2): 129-38.
- 184.** Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, et al.: Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 48623-6.
- 185.** Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J: The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(1): 19-25.
- 186.** Ferrario CM: Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47(3): 515-21.

- 187.** Nguyen G: The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(2): 129-33.
- 188.** Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y: The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002; 277(34): 30429-35.
- 189.** Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB: A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(18): 12670-4.
- 190.** Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B: A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21(22): 1853-8.
- 191.** Covolo L, Gelatti U, Metra M, et al.: Role of beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms in heart failure: a case-control study. *Eur Heart J* 2004; 25(17): 1534-41.
- 192.** Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, et al.: Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and evaluation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. CARDIGENE Group. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(5): 1025-32.
- 193.** Iwai C, Akita H, Shiga N, et al.: Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2002; 66(8): 723-8.
- 194.** Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB: Synergistic polymorphisms of beta(1)- and alpha(2C)-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347(15): 1135-1142.

- 195.** Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, et al.: Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78(3): 221-31.
- 196.** Forleo C, Resta N, Sorrentino S, et al.: Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 2004; 117(7): 451-8.
- 197.** White HL, de Boer RA, Maqbool A, et al.: An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *Eur J Heart Fail* 2003; 5(4): 463-8.
- 198.** Liggett SB, Miallet-Perez J, Thaneemit-Chen S, et al.: A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(30): 11288-93.
- 199.** Wagoner LE, Craft LL, Zengel P, et al.: Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor predict exercise capacity in heart failure. *Am Heart J* 2002; 144(5): 840-6.
- 200.** Mancini DM, Eisen H, Kussmaul W, Mull R, Edmunds LH, Jr., Wilson JR: Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 1991; 83(3): 778-86.
- 201.** Mancini D, LeJemtel T, Aaronson K: Peak VO(2): a simple yet enduring standard. *Circulation* 2000; 101(10): 1080-2.
- 202.** Miallet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, et al.: Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003; 9(10): 1300-5.

- 203.** Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, et al.: Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(4): 227-34.
- 204.** de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, et al.: Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(3): 137-42.
- 205.** Brodde OE, Leineweber K: Beta2-adrenoceptor gene polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(5): 267-75.
- 206.** Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB: Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 1994; 33(32): 9414-9.
- 207.** Xie HG, Stein CM, Kim RB, et al.: Frequency of functionally important beta-2 adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics* 1999; 9(4): 511-6.
- 208.** Bruck H, Leineweber K, Buscher R, et al.: The Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism slows the onset of desensitization of cardiac functional responses in vivo. *Pharmacogenetics* 2003; 13(2): 59-66.
- 209.** Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, et al.: The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998; 102(8): 1534-9.
- 210.** Kaye DM, Smirk B, Williams C, Jennings G, Esler M, Holst D: Beta-adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. *Pharmacogenetics* 2003; 13(7): 379-82.

- 211.** Green SA, Cole G, Jacinto M, Innis M, Liggett SB: A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(31): 23116-21.
- 212.** Wagoner LE, Craft LL, Singh B, et al.: Polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res* 2000; 86(8): 834-40.
- 213.** Leineweber K, Tenderich G, Wolf C, et al.: Is there a role of the Thr164Ile-beta(2)-adrenoceptor polymorphism for the outcome of chronic heart failure? *Basic Res Cardiol* 2006; 101(6): 479-84.
- 214.** Lobmeyer MT, Gong Y, Terra SG, et al.: Synergistic polymorphisms of beta1 and alpha2C-adrenergic receptors and the influence on left ventricular ejection fraction response to beta-blocker therapy in heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17(4): 277-82.

CHAPITRE II

**Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian
Caucasian patients with heart failure.**

publié dans

British Journal of Clinical Pharmacology

2008 May;65(5):742-51.

Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure.

Marcin Zakrzewski-Jakubiak*, B.Pharm, M.Sc¹

Simon de Denus, B.Pharm, M.Sc^{1,2}

Marie-Pierre Dubé, Ph.D²

François Bélanger, M.Sc¹

Michel White, MD²

Jacques Turgeon, B.Pharm, Ph.D¹

*submitting author

Institution :

¹Université de Montréal, Montréal, Canada

²Montreal Heart Institute, Montréal, Canada

Corresponding author:

Jacques Turgeon, B.Pharm, Ph.D

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,

Hôtel-Dieu, pavillon Masson

3850, Saint-Urbain, room 8-213

Montréal (Québec) H2W 1T7

Préambule

Pour répondre aux objectifs émis dans la section 2.0 de cette thèse, cette première étude vise à discuter de la place des variantes génétiques dans la relation cause-maladie évoquée précédemment. L'évaluation ici-présente aborde la présence de certaines variantes génétiques putatives comme facteurs de risque de l'IC. Mais avant tout, le but premier fut de rehausser la quantité de données scientifiques traitant des variantes génétiques dans cette maladie, particulièrement à ce qui a trait à une population caucasienne de descendance française. Tout d'abord, le lecteur peut apprécier la substantielle compilation de fréquences alléliques et génotypiques de divers polymorphismes reliés aux gènes candidats impliqués dans la pathophysiologie de l'IC. La distinction proéminente de cette compilation est qu'elle fut effectuée dans une population de volontaires sains, représentant ainsi des vraies fréquences populationnelles de base pouvant servir comme référence pour plusieurs études futures nécessitant cette information. En plus de répertorier ces données en un seul endroit, cette étude va à l'encontre d'une grande majorité de publications semblables qui furent réalisés chez des individus sains appariés pour l'âge, et donc à risque d'erreurs de classification. Subséquemment, vu le grand nombre de polymorphismes analysés, une évaluation d'interaction gène-gène et d'haplotypes a pu être effectuée, une rareté dans le domaine de l'IC.

Résumé

Les différences raciales dans la survie pointent vers un rôle génétique dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. En outre, des évidences contemporaines lient la génétique à la prédisposition à l'insuffisance cardiaque (IC). Nous avons évalué les différences de prévalence des polymorphismes au niveau de dix gènes reliés au système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) entre une population homogène de patients en IC et des témoins sains.

Cent onze volontaires sains et 58 patients en IC ont été inclus dans cette étude. Le groupe de contrôle était composé d'hommes sains âgés entre 18 et 35 ans. Le groupe atteint d'IC se composait de patients (hommes 89,7%) qui étaient âgés de $63,8 \pm 7,9$ ans, étaient en classe II-III de la New York Heart Association (NYHA) et avaient une fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) $\leq 40\%$, tel que documenté dans les 6 derniers mois. En dépit d'être traités maximale pour leur condition avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et des β -bloquants, ils continuaient d'être symptomatique et ainsi représentaient une population de patients hautement spécialisée et homogène. Les deux groupes étaient composés de personnes canadiennes de race blanche. Les polymorphismes analysés étaient les suivants: enzyme de conversion d'angiotensine (ACE) (I/D), récepteur de type I d'angiotensine-II (AGTR1) (A1166C), l'angiotensinogène (AGT) (M235T et T174M), la synthase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS) (T-786C et Glu298Asp), le récepteur β 2-adrénergique (ADRB2) (Gln27Glu), le récepteur β 2 de la bradykinine (BDKRB2) (+9 / -9), l'aldostérone synthase (CYP11B2) (T-344C) et l'adducine-1 (ADD1) (Gly460Trp).

L'allèle T235 de l'AGT a été plus fréquente dans notre groupe de patients atteints d'IC [$p=0,0025$, OR: 2.02, 95%CI (1,24 à 3,30)]. L'haplotype M174-T235 de l'AGT a également été associé au phénotype d'IC ($p = 0,0069$). Une évaluation exploratrice de combinaisons gène-gène

a révélé une association indicative du polymorphisme combiné AGT (T235) / ACE(D) avec l'IC [p=0.02, OR: 2.12, 95%CI (1,11 à 4,06)].

Cette étude démontre que les polymorphismes mononucléotides de l'AGT peuvent être associés à l'IC dans notre population et que la combinaison des gènes AGT/ECA peut jouer un rôle important dans la prédisposition à cette maladie.

Summary

Aims: Racial differences in survival outcomes point toward a genetic role in the pathophysiology of heart failure. Furthermore, contemporary evidence links genetics to heart failure (HF) predisposition. We tested for a difference in the prevalence of 10 renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)-related gene polymorphisms between a homogenous population of HF patients and healthy controls.

Methods: One hundred eleven healthy volunteers and 58 HF patients were included in this study. The healthy control group consisted of males aged between 18 and 35 years old. The HF group consisted of patients (89.7% male) that were 63.8 ± 7.9 years old, were in New York Heart Association (NYHA) class II-III and had a documented left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 40\%$ within the previous 6 months. Despite being treated maximally for their condition with angiotensin-converting-enzyme (ACE)-inhibitors and beta-blockers, they continued to be symptomatic and, as such, compose a highly specialized and homogeneous patient population. Both groups were composed of Canadian Caucasians. The analysed polymorphisms were: ACE(I/D), angiotensin-II-receptor-type-1 (AGTR1) (A1166C), angiotensinogen (AGT) (M235T&T174M), endothelial-nitric-oxide-synthase (eNOS) (T-786C&Glu298Asp), adrenergic-receptor- $\beta 2$ (ADRB2) (Gln27Glu), bradykinin-receptor- $\beta 2$ (BDKRB2) (+9/-9), aldosterone-synthase (CYP11B2) (T-344C) and adducin-1 (ADD1) (Gly460Trp).

Results: The AGT(T235) allele [$p=0.0025$, OR: 2.02, 95%CI (1.24-3.30)] was found to be more prevalent in our HF group. The AGT(174M)-AGT(235T) haplotype was also associated with the HF phenotype ($p=0.0069$). Exploratory evaluation of gene-gene combinations revealed an

indicative association of the AGT(T235)/ACE(D) combined polymorphisms in the HF group [p=0.02, OR: 2.12, 95%CI (1.11-4.06)].

Conclusion: This study demonstrates that the SNPs of AGT may be associated with HF in our population and that the AGT/ACE gene combination may play an important role in disease predisposition.

1. Introduction

Heart failure (HF) is a major cause of morbidity and mortality (1). It remains an increasingly prevalent illness where only half of the patients survive beyond five years after diagnosis (2). Despite being progressively debilitating, this condition does not affect everybody equally and its evolution and pharmacological response are subjected to heterogeneity among individuals (3). Indeed, racial differences in survival outcomes point toward a genetic role in the pathophysiology of HF (4). Great attention has therefore been drawn toward the genetic makeup of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), a neurohormonal pathway that is activated in HF patients. The RAAS plays a major role in the pathophysiology of HF and its chronic stimulation negatively affects the already failing heart through, most importantly, increased vasoconstriction, sodium and water retention, heart remodelling and myocardial fibrosis (5). Moreover, its blockade is strongly advocated by the current American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) Heart Failure management guidelines through the use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors (ACEIs), angiotensin II type 1 receptor blockers (ARBs) and aldosterone antagonists (6). Given the value of RAAS as a therapeutic target in this disease, variance in the genetic constitution of this system may represent a predisposing factor to HF and be implicated in the risk of disease manifestation in certain patients.

Whereas several studies found an association between certain RAAS-related gene polymorphisms and HF (7-9), others did not (10-12). The most promising results actually came from studies considering major risk factors for HF, such as by Cambien *et al.* (13), which found

that the DD genotype of the ACE gene, coding for the angiotensin-converting enzyme, was significantly more prevalent in patients with myocardial infarction than in controls. That finding was further substantiated in a meta-analysis by Samani *et al.* (14) and subsequently deemed of relatively modest significance in an updated meta-analysis that included an additional large case-control study (15). Furthermore, numerous studies implicated the DD genotype in other pathological conditions considered as key risk factors for HF, such as hypertrophic cardiomyopathy (16, 17) and hypertension (18, 19), albeit with inconsistent results. In the context of HF predisposition, the other substantially studied genetic variant of the RAAS-related genes is the angiotensinogen (AGT) M235T single nucleotide polymorphism (SNP). Most studies did not find an association between that SNP and an increased risk of HF (12, 20). Nonetheless, Goldbergova *et al.* (21) did reveal a disease-related haplotype (GGMT). Furthermore, numerous studies demonstrated a connection between the AGT 235TT genotype and cardiac hypertrophy in Asian populations (22, 23), where incidentally the T allele has a higher frequency.

The RAAS is composed of numerous components, where consequences of one polymorphism may be counterbalanced by compensatory effects of another. The aim of the present study was to analyse associations between ten polymorphisms within RAAS-related genes (Figure 1) and risk of HF in a homogenous, maximally treated population of patients, and to compare gene frequencies between Canadian Caucasians with other ethnic groups. A supplementary objective was to perform an exploratory evaluation of the association of certain gene-gene combinations within the studied ten RAAS-related genes with the risk of HF. The gene combinations were selected according to their pathological relevance and based on the rationale that the possible deleterious effect of one polymorphism may be further increased by a subsequent polymorphism that lies in line relatively to the studied pathway; whereas the allele

selected for each combination was the one deemed heart-detrimental from earlier reports (24-35). Due to the limited number of HF patients, we restrained our analysis to a selection of 11 combinations of two gene polymorphisms, and 2 triple combinations consisting of the ACE(D)/AGTR1(1166C)/ CYP11B2(C) and ATG(235T)/ACE(D)/CYP11B2(C) alleles.

2. Methods

2.1. Study Population

The HF group was derived from patients participating in a multicenter clinical trial that agreed to participate in a pharmacogenetic sub-study. Briefly, that multicenter clinical study was a randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating the effects of candesartan in patients with stable systolic HF already on an ACE inhibitor treatment. Patients included were ≥ 18 years old and had symptomatic HF of the New York Heart Association (NYHA) functional class II-IV for at least 3 months prior to randomization. The patients also had a documented left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 40\%$ within the previous 6 months. Recruited patients were required to receive a stable dose of an ACE inhibitor for at least a month prior to inclusion. Major exclusion criteria were: treatment with an ARB within 8 weeks prior to randomization, known hypersensitivity to an ARB, serum creatinine $\geq 200 \mu\text{mol/L}$, serum potassium $\geq 5 \text{ mmol/L}$, a history of ACE inhibitor induced hyperkalemia, bilateral renal stenosis, symptomatic hypotension and/or systolic blood pressure $\leq 85 \text{ mmHg}$, stroke, acute MI or open heart surgery within the last 4 weeks before randomization, significant liver disease, connective tissue disease of chronic inflammatory condition, and any other condition that in the opinion of the investigator would jeopardize the evaluation of the efficacy or the safety of candesartan. The healthy control group was comprised of 18 to 35 years old male volunteers that had no history of cardiovascular disease.

All participating HF patients signed an informed consent form specific to the genetic sub-study, which was approved by all the participating centers, in addition to signing the informed consent form to participate in the main trial. The volunteer group also signed an informed consent form relevant to genetic research that was approved by the ethics committee of the Quebec Heart Institute.

2.2. Genotyping

A 7ml blood sample was collected in an EDTA-containing tube at anytime during the main study or after its completion and was kept at room temperature (for a maximum of 24 hours) or at 4°C (for a maximum of 7 days) until the deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated. DNA extraction from whole blood was performed with the GenElute Blood Genomic DNA Kit (NA2000 Sigma, USA). Extracted DNA was then stored at –20°C until genotyping was performed. The studied gene polymorphisms were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and processed by restriction enzymes (when needed). The processed PCR products were then analysed by electrophoresis on agarose gels and visualized by ethidium bromide staining under an UV light. Because of the expected small number of patients participating in the genetic sub-study, examination of genetic polymorphisms was limited to those with known high allele frequencies. Therefore, genotyping was performed for the following gene polymorphisms according to previously published protocols: ACE I/D (36) (rs1799752), AGT T174M (37) (rs4762), AGT M235T (38) (rs699), angiotensin II type I receptor (AGTR1) A1166C (39) (rs5186), aldosterone synthase (CYP11B2) C-344T (40) (rs1799998), bradykinin β_2 receptor (BDKRB2) +9/-9 insertion/deletion (41) (rs5810761), α -adducin (ADD1) Gly460Trp (42) (rs4961), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298Asp (43) (rs1799983), eNOS T-786C

(44) (rs2070744), β_2 -adrenergic receptor (ADRB2) Gln27Glu (32) (rs1042714). To eliminate the possibility of mistyping subjects heterozygous for the ID alleles of the ACE gene as D homozygous due to the preferential amplification of the D allele and the inefficiency in amplification of the I allele of the ACE gene (45), an additional PCR using insertion-specific primer pair, which recognizes only the insertion sequence, was performed (DD check) (46). In addition, because the ATR1 A1166C gene polymorphism was not in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.03$) in the HF group, all heterozygotes were re-genotyped with an additional technique to exclude genotypic errors (47).

2.3. Statistical analysis

To test for Hardy-Weinberg equilibrium, the expected genotype frequencies were calculated from the allele frequencies and deviation from the observed genotype frequencies was determined using the chi-square statistic and 10,000 replicates were used for exact p -value computations. Genetic association was tested by comparing allele and genotype frequencies between the HF group and the healthy group using a contingency table and a chi-squared analysis or the Fisher's exact test if necessary. The Armitage trend test was substituted for the allele test in the analysis of AGTR1 as Hardy-Weinberg equilibrium was not met. Haplotype association was assessed using an omnibus test performed over all haplotypes with a likelihood ratio statistic testing the null hypothesis of no likelihood ratio differences between cases and controls, using EM haplotype estimates and by computing exact p -values with 100,000 Monte Carlo replicates. Linkage disequilibrium was evaluated at AGT and eNOS using the D' statistic with EM-inferred haplotypes and the composite linkage disequilibrium statistic was used to test for departure from the null expectation of no linkage disequilibrium using the chi-square test. Statistical analyses

were conducted with SAS v.9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All tests were two-sided with significance threshold set to 0.05. Exploratory statistics investigating the role of gene-gene combination of variant alleles were conducted with the statistical program NCSS (Hintze, J; 2001. NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah. www.ncss.com). All exploratory tests were two-sided with significance threshold set to 0.05. Group sample sizes of 58 cases and 111 controls achieve 80% power to detect an allele frequency difference of 0.16 (Odds ratio: 1.98) for an allele of 35% population frequency, using a two-sided Chi-square test with continuity correction and with a significance level of 0.05.

3. Results

The HF group consisted of 58 individuals (Table 1). These patients were mostly male (89.7 %) Caucasians (100%), aged 63.8 ± 7.9 years old, with a mean LVEF of $27.3\% \pm 7.5$ and with mainly an ischemic subjacent cause to their HF (89.7%). Almost a third was diabetic (31%). All patients were receiving an ACE inhibitor and 93.1% were also on a beta-blocker therapy. The unmatched, heart-healthy, control group consisted of 111 young Caucasian males aged between 18 and 35 years old. Those individuals were exclusively of French-Canadian descendants.

All of the studied genotype distributions were compatible with Hardy-Weinberg expectations in both cases and controls, with the exception of the AGTR1 A1166C gene polymorphism in the HF group ($p=0.03$). After re-genotyping all of the heterozygotes for that polymorphism with another genotyping protocol (47), no patient was in need of reclassification, making genotyping errors as a cause for the Hardy-Weinberg deviation improbable. The genotype frequencies in the healthy male French-Canadian population, as well as their comparison with the HF group, are demonstrated in Table 2.

We noted a significant difference of the AGT T235 allele ($p=0.0025$) in the HF patients with frequencies of 48.3% in HF patients versus 31.5% in the controls. The AGT M174 allele was also present in 18.1% of HF patients versus 10.4% of healthy controls ($p=0.0446$). Those two polymorphisms were in prominent linkage disequilibrium (LD) together in the HF group ($p<0.003$) and in the healthy group ($p<0.005$) given that the T235 allele was more common in individuals with at least one M174 allele ($D'=0.731$). We conducted a haplotype association test

with the alleles of the AGT gene. The haplotype consisting of the variant alleles at both loci, AGT M174 and AGT T235, was present in 18.1% of HF patients versus 8.4% of healthy controls. The likelihood ratio statistic using exact p-value computation found a strong association with $p=0.0069$.

With regards to the nine other gene polymorphisms studied, none attained the threshold of significance, though the BDKRB2 +9/-9 polymorphism reached borderline significance ($p=0.0670$) with 39.5% of patients carrying the insertion versus 50.0% of controls.

Subsequently, we conducted an exploratory study comparing the distribution of selected gene combinations in the HF and healthy control groups. There was an increased frequency of patients having at least one ACE(D) allele in combination with at least one ATG(T235) allele in the HF group when compared to the frequency of patients having that combination in the healthy group ($p<0.02$) (OR=2.12, IC95% 1.11-4.06). Other gene combinations tested yielded no significant results (Table 3).

We retrieved published genotype frequencies of our tested gene polymorphisms for various ethnic groups (Table 4) for descriptive comparison purposes that are intended to be qualitative in nature only. Compared to other Caucasians, our population had a similar distribution of allele and genotype frequencies. One could argue for a slight difference in the genotype frequency of the AGT M235T and the AGTR1 A1166C SNPs, however the data representing Caucasians in this table was retrieved from various sources having included diverse populations (ex. Germans, French, English, Scandinavians, etc.). Conversely, the Asian population differs widely from our population with respect to practically every gene

polymorphism studied, except for the AGT T174M SNP. The most striking difference lies in the BB₂R +/- polymorphism, where the Asian population is solely composed of -/- homozygotes. Moreover, certain SNPs' genotypic distribution is reversed when compared to Caucasian populations (ex. wild-type/wild-type > variant/variant for Caucasians and variant/variant > wild-type/wild-type for Asians), such as in the case of the AGT M235T, ACE I/D and the ADD1 Gly460Trp gene polymorphisms. At last, the African-American and the African populations, which were virtually similar in terms of their genotypic frequencies, also appeared extensively divergent from our population.

4. Discussion

Our results report an increased frequency of the AGT T235 allele and the AGT 235TT genotype in HF patients. In addition, the AGT M174 allele was also significantly more prevalent in the HF group. The haplotype consisting of these variant alleles at both loci (AGT M174/AGT T235) was more prevalent in patients compared with controls, as was the ACE(D)/AGT(T235) allele combination. It is important to underline the fact that our results stem from a maximally treated patient population that represented a narrow NYHA class (II & III only), were all white and were drawn from the same geographical basin, and as such, represent a homogenous population of HF affected individuals.

The consistent result of both studied AGT SNPs being significantly more prevalent in the HF patients reflect their prominent linkage disequilibrium, a finding also shown by others (48, 49). Whereas most studies did not find an association between the angiotensinogen M235T SNP and the development of HF (12, 50, 51), our outcome is, on the contrary, highly significant with a p-value of 0.0025.

Mindful of the deleterious effects of the RAAS on the prognosis of HF and the importance of angiotensinogen as the initial step of this pathway, any variation increasing its levels could be considered as detrimental. Indeed, the angiotensinogen levels are increased in a stepwise manner with the number of T235 alleles (26, 52). Additionally, animal data provided evidence that angiotensinogen levels influence blood pressure, and hypertension is the major risk factor for HF. Furthermore, transgenic animals overexpressing the AGT gene had an elevation in

blood pressure and, conversely, AGT-knock-out mice had a reduction in blood pressure (53, 54). Human data also suggest a connection of the T235 variant with hypertension (55-59). However, the majority of studies evaluating the role of this variant in the context of myocardial remodelling have not been able to identify any association (60-64).

The ACE I/D and the AGTR1 A1166C gene polymorphisms are probably the most studied genetic variants in the field of cardiovascular disease. Since the products of those two genes are directly implicated in the pharmacological modulation of the RAAS, they evidently rouse great interest. We noted no difference in genotype frequency between the healthy and the HF groups, neither in the ACE, nor in the AGTR1, gene polymorphisms. However, the AGTR1 A1166C gene polymorphism was not in Hardy-Weinberg equilibrium in the latter group. Since re-genotyping produced no patient reclassification, hence making genotypic errors unlikely, a survival bias could be evoked. Indeed, although not statistically significant, the HF group had a lower proportion of patients with the CC genotype (3.5%) when compared to the healthy group (11.8%). On the other hand, susceptibility to HF may only be present in particular situations, such as the concomitant presence of other risk factors for that disease. Indeed, Hindorff LA *et al.* (65) demonstrated that although the AGTR1 A1166C SNP was not associated with any incident cardiovascular events in the overall studied population, treated hypertensives with the CC genotype were more likely to develop HF and ischemic stroke during their follow-up. Similarly, the incidence rate of HF increased with the number of D-alleles of the ACE gene only in hypertensive, and not normotensive, patients in a study by Schut AF *et al.* (65). In those cases, hypertension seems to act as a trigger that renders the ACE D and the AGTR1 C alleles significant in the predisposition to HF. Similarly, one could also envisage a genetic variance in the upstream genes being that trigger and fuelling the whole pathway, such as the AGT M235T

gene polymorphism for instance. To our knowledge however, our study is the first to reveal an indicative association of the AGT(T235)/ACE(D) combined polymorphisms with HF predisposition. Nevertheless, a fine example of such gene-gene interaction was presented for a hypertension model by Rankinen *et al.* (67) demonstrating an impaired blood pressure training response in only those men that carried both the AGT 235TT genotype and at least one ACE D allele. These findings are along the lines of a subcohort study of the Framingham Heart Study showing that the increased risk of hypertension associated with the AGT 235TT genotype is further elevated in subjects also carrying the ACE DD genotype (59). Since hypertension is a direct major risk factor for HF (also indirectly through myocardial infarction), one can stipulate that down the road the AGT M235T-ACE I/D interaction can indeed augment the risk of HF.

On the other hand, certain gene polymorphisms may indeed be more important in the progression of a disease rather than in its predisposition. This in turn may cause a survival bias when analysing results from association studies. For example, Andersson B *et al.* (68) illustrated that HF patients with the ACE DD genotype had a significantly higher 5-year mortality than their II/ID counterparts. In this case, since the II/ID patients have a longer longevity, they presumably also have a higher chance of being recruited in a study, artificially inflating their composition in frequency analysis. Therefore, studies having missed the ACE DD association with HF and reported similar genotype frequencies between HF patients and controls may indeed have fallen victim to the selective survival of II/ID patients and selective mortality for the DD patients.

One major contribution of this study resides in the characterization of genotype frequencies for ten polymorphisms related to the RAAS in a healthy young male French-Canadian population, which served as our control group. The advantage of this control group is

that it represents the basal frequency of the polymorphisms in our population, before survival selection supposedly occurs. Furthermore, phenotype characterization with such a group is not an issue, whereas in age-matched genetic association studies of older individuals, a patient could one day be included in the control group, and the next, after a heart attack for example, in the case group. The selection of a random control group for the case-control association tests, however, does not isolate HF as well as it would have been possible with a similarly ascertained population matched for important covariates. As such, the interpretation of results with respect to HF has to be considered with care. However, we consider that limitation, when weighed against survival selection and phenotype misclassification, a reasonable trade-off. Furthermore, we praise the method of carefully selecting the HF population in order to avoid any dilution of associations, a shortcoming encountered frequently when the studied group is not uniform. We have therefore decided to make our studied group as homogenous as possible with regards to their disease stage, their pharmacological response, their ethnic background as well as their geographical location. The obvious drawback of choosing such a tight population is that they come in a short supply and are therefore difficult to recruit, which clearly limits our number of study subjects. Indeed, the modest number of participants recruited is clearly the principal limitation of this study. We therefore advocate that these results be replicated in a larger trial. Nevertheless, given our allele frequencies for M235T, we had 83% power to detect the resulted difference in spite of the limited number of subjects. We believe that selecting a uniform group of individuals allows for a gene effect to concentrate and is consequently easier to detect, which is reflected in our highly statistically significant results.

5. Conclusion

Our study indicates that the AGT M235T polymorphism may very well be associated with HF predisposition. Also, the same may apply to the AGT(235T)/ACE(D) gene-gene polymorphism combination. Although the majority of RAAS-related gene polymorphisms studied in this trial were not associated with a risk for predisposition to HF, other polymorphisms that we have not included in our analysis may indeed play that role. Furthermore, due to our limited sample size, we cannot exclude that these variants do indeed have an impact, yet individually minor, on the risk of HF development. HF is probably caused by many genetic factors that are all components of larger complex systems that interact with environmental factors. Besides the need for larger studies to examine the effects of single genetic variants and haplotypes, future studies also need to focus on the complexity of these systems and study gene-gene interactions and gene-environment interactions.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and by an investigator-driven grant from Astra-Zeneca.

Table Legends

Table 1: Characteristics of the heart failure population

Table 2: Comparison of genotype frequencies between the healthy and the heart failure patients

Table 3: Frequency of individuals with selected allele combinations

Table 4: Comparison of genotype frequencies between the French-Canadian population and other ethnic groups

Table 1: Characteristics of the heart failure population

Variables	n=58
Men, %	89.7
Caucasians, %	100
Age, yrs	63.8 ± 7.9
Ischemic HF, %	89.7
LVEF, %	27.3 ± 7.5
NYHA class II/III/IV, %	56.9/43.1/0
Diabetes, %	31.0
Atrial fibrillation, %	24.1
Pharmacological treatment (%)	
ACE inhibitors	100
Beta-blockers	93.1
Digoxin	62.1
Furosemide	75.9
Spironolactone	27.6
Lipid-lowering agent	89.7

Mean ± SD

Table 2: Comparison of genotype frequencies between the healthy and the heart failure patients

Gene (wt/mut)							Genotype	Allele
	Healthy			Heart Failure			test	test
	wt/wt	mut/wt	mut/mut	wt/wt	mut/wt	mut/mut	p-value	p-value
ACE (I/D)	18	47	45	5	31	22	0.2800	0.7265
	16.4%	42.7%	40.9%	8.6%	53.5%	37.9%		
AGTR1 (A1166C)	48	49	13	23	33	2	0.1205	0.7081 [†]
	43.6%	44.6%	11.8%	39.7%	56.9%	3.5%		
AGT (M235T)	51	50	10	16	28	14	0.0074	0.0025
	46.0%	45.1%	9.0%	27.6%	48.3%	24.1%		
AGT (T174M)	88	23	0	38	19	1	0.0483	0.0446
	79.3%	20.7%		65.5%	32.8%	1.7%		
eNOS (T-786C)	41	53	17	15	34	9	0.3128	0.3498
	36.9%	47.8%	15.3%	25.9%	58.6%	15.5%		
eNOS (Glu298Asp)	40	57	14	22	23	12	0.2731	0.6367
	36.0%	51.4%	12.6%	38.6%	40.4%	21.1%		
ADRB2 (Gln27Glu)	26	65	20	21	27	10	0.2195	0.2490
	23.4%	58.6%	18.0%	36.2%	46.6%	17.2%		
BDKRB2 (+9/-9)	26	59	26	23	23	11	0.0802	0.0670
	23.4%	53.2%	23.4%	40.4%	40.4%	19.3%		
CYP11B2 (T-344C)	34	54	23	23	22	12	0.3872	0.4248
	30.6%	48.7%	20.7%	40.4%	38.6%	21.1%		
ADD1 (Gly460Trp)	69	38	4	37	21	0	0.4452	0.6707
	62.2%	34.2%	3.6%	63.8%	36.2%			

[†]Armitage trend test

Table 3: Frequency of individuals with selected allele combinations

	Healthy (%)	Heart failure (%)	p-value	Odds ratio (95% CI)
≥ 1 allele AGT 235T & ≥ 1 allele ACE D	45.0	63.8	0.02	2.12 (1.11-4.06)
≥ 1 allele AGT 235T & ≥ 1 allele AGTR1 C	30.9	44.8	0.07	1.81 (0.94-3.47)
≥ 1 allele AGT 235T & ≥ 1 allele CYP11B2 C	37.8	44.8	0.38	1.33 (0.70-2.53)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele AGTR1 C	47.7	53.4	0.48	1.25 (0.67-2.36)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele CYP11B2 C	57.7	55.2	0.76	0.90 (0.48-1.70)
≥ 1 allele AGTR1 C & ≥ 1 allele CYP11B2 C	40.0	36.8	0.69	0.88 (0.46-1.69)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele BDKRB2 +9	64.9	56.9	0.31	0.72 (0.38-1.36)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele eNOS -786C	54.1	65.5	0.15	1.60 (0.83-3.07)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele eNOS 298Asp	57.6	58.6	0.90	1.04 (0.55-1.97)

≥ 1 allele BDKRB2 +9 & ≥ 1 allele eNOS -786C	49.5	48.3	0.88	0.95 (0.51-1.79)
≥ 1 allele BDKRB2 +9 & ≥ 1 allele eNOS 298Asp	47.7	39.7	0.32	0.72 (0.38-1.37)
≥ 1 allele ACE D & ≥ 1 allele AGT 235T & ≥ 1 allele CYP11B2 C	32.4	39.7	0.35	1.37 (0.71-2.63)
≥ 1 allele AGT 235T & ≥ 1 allele AGTR1 C & ≥ 1 allele ACE D	26.1	37.9	0.11	1.72 (0.88-3.38)

TABLE 4: Comparison of genotype frequencies between the French-Canadian population and other ethnic groups

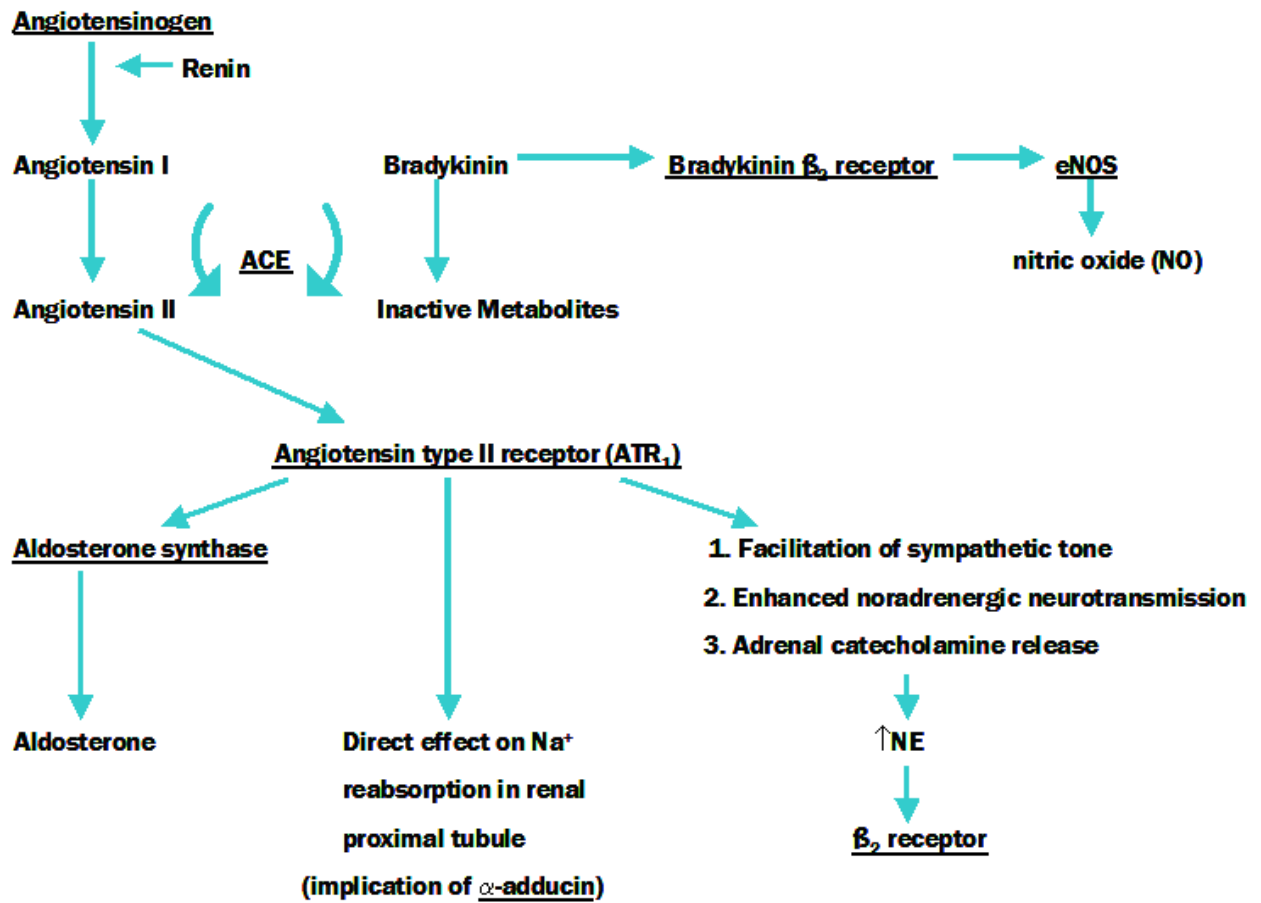
	ACE (I/D)	AGTR1 (A1166C)	AGT (M235T)	AGT (T174M)	CYP11B2 (T-344C)	ADD1 (Gly460Trp)	ADRB2 (Gln27Glu)	BDKRB2 (+/-)	eNOS (T-786C)	eNOS (Glu298Asp)
Africans (black)	DD: 29.2-44 ID: 41.5-49.6 II: 14.5-21.2	AA: 90 AC: 10 CC: 0	MM: 4 MT: 27 TT: 69	TT: 91 MT: 9 MM: 0	TT: 62 TC: 34 CC: 4	GG: 94 GT: 6 TT: 0	GnGn: 69 GnGu: 28 GuGu: 3			
African- Americans	DD: 34 ID: 48 II: 18	AA: 88 AC: 11 CC: 1	MM: 3 MT: 28 TT: 69	TT: 86-90 MT: 9-14 MM: 0	TT: 52 TC: 40 CC: 8	GG: 76 GT: 21 TT: 3	GnGn: 66 GnGu: 30 GuGu: 4	++: 35 +-: 45 --: 19	TT: 67 TC: 31 CC: 2	GG: 79 GA: 20 AA: 1
Asians	DD: 17-29 ID: 34-36 II: 36-49	AA: 84 AC: 15 CC: 1	MM: 8 MT: 42 TT: 50	TT: 86 MT: 14 MM: 0	TT: 49 TC: 44 CC: 7	GG: 25 GT: 49 TT: 27	GnGn: 85 GnGu: 14 GuGu: 1	++: 0 +-: 0 --: 100	TT: 83 TC: 16 CC: 1	GG: 86 GA: 13 AA: 1
Caucasians	DD: 25-41 ID: 39-57 II: 17-25	AA: 52 AC: 39 CC: 9	MM: 28-40 MT: 41-53 TT: 13-28	TT: 72 MT: 26 MM: 2	TT: 29 TC: 52 CC: 18	GG: 57.0-74 GT: 20-37.0 TT: 2.6-8	GnGn: 36 GnGu: 48 GuGu: 16	++: 22 +-: 50 --: 28	TT: 30 TC: 47 CC: 24	GG: 41 GA: 46 AA: 13
French	DD: 40.9	AA: 43.6	MM: 45.9	TT: 79.3	TT: 30.6	GG: 62.2	GnGn: 23.4	++: 23.4	TT: 36.9	GG: 36.0
Canadians	ID: 42.7 II: 16.4	AC: 44.6 CC: 11.8	MT: 45.1 TT: 9.0	MT: 20.7 MM: 0	TC: 48.7 CC: 20.7	GT: 34.2 TT: 3.6	GnGu: 58.6 GuGu: 18.0	+-: 53.2 --: 23.4	TC: 47.8 CC: 15.3	GA: 51.4 AA: 12.6

Genotype frequency is presented in %
¹ n/a = not available

Figure Legends

Figure 1: Renin-angiotensin-aldosterone pathway and other related systems

Figure 1: Renin-angiotensin-aldosterone pathway and other related systems



Note: genes coding for the underlined components of this pathway formed part of this study

References

1. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;112(12):e154-235.
2. Givertz MM. Underlying causes and survival in patients with heart failure. *N Engl J Med* 2000;342(15):1120-2.
3. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991;325(5):303-10.
4. Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Cooper HA, Carson PE, Domanski MJ. Racial differences in the outcome of left ventricular dysfunction. *N Engl J Med* 1999;340(8):609-16.

5. Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 2001;345(23):1689-97.
6. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult-Summary Article A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2005;46(6):1116-43.
7. Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993;342(8879):1073-5.
8. Harn HJ, Chang CY, Ho LI, Liu CA, Jeng JR, Lin FG, Jent W. Evidence that polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene may be related to idiopathic dilated cardiomyopathy in the Chinese population. *Biochem Mol Biol Int* 1995;35(6):1175-81.
9. Pilbrow AP, Palmer BR, Frampton CM, Yandle TG, Troughton RW, Campbell E, Skelton L, Lainchbury JG, Richards AM, Cameron VA. Angiotensinogen M235T

- and T174M gene polymorphisms in combination doubles the risk of mortality in heart failure. *Hypertension* 2007;49(2):322-7.
10. Montgomery HE, Keeling PJ, Goldman JH, Humphries SE, Talmud PJ, McKenna WJ. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995;25(7):1627-31.
 11. Vancura V, Hubacek J, Malek I, Gebauerova M, Pitha J, Dorazilova Z, Langova M, Zelizko M, Poledne R. Does angiotensin-converting enzyme polymorphism influence the clinical manifestation and progression of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy? *Am J Cardiol* 1999;83(3):461-2, A10.
 12. Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour JB, Roizes G, Desnos M, Dorent R, Schwartz K, Cambien F, Komajda M. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(1):29-35.
 13. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359(6396):641-4.
 14. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94(4):708-12.
 15. Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, Delepine M, Lathrop M, Peto R, Collins R. Large-scale test of hypothesised associations

- between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. *Lancet* 2000;355(9202):434-42.
16. Pfeufer A, Osterziel KJ, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, Dietz R, Luft FC. Angiotensin-converting enzyme and heart chymase gene polymorphisms in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996;78(3):362-4.
 17. Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R, et al. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92(7):1808-12.
 18. Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogihara T. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men: the Suita Study. *Circulation* 2000;101(17):2060-5.
 19. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;97(18):1766-72.
 20. Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens* 1997;10(8):921-8.

21. Goldbergova M, Spinarova L, Spinar J, Toman J, Vasku A, Vacha J. Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G(-6)A, with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2003;89(2-3):267-72.
22. Wang AY, Chan JC, Wang M, Poon E, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Cardiac hypertrophy and remodeling in relation to ACE and angiotensinogen genes genotypes in Chinese dialysis patients. *Kidney Int* 2003;63(5):1899-907.
23. Kim HS, Lee MM, Oh BH, Kim KI, Han KH, Park SK, Sohn DW, Yoo KY, Park YB, Choi YS, Lee YW. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene on cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol* 2000;72(2):151-61.
24. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86(4):1343-6.
25. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92(6):1387-8.
26. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, Zotz R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Gross W, Galton DJ, Marz W. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J* 1999;137(4 Pt 1):698-705.
27. Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics* 2002;3(1):65-73.

28. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, Kahan T, Malmqvist K, Ohman P, Nystrom F, Hagg A, Lind L. Aldosterone synthase (CYP11B2) -344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens* 2002;15(5):389-93.
29. Tsukada K, Ishimitsu T, Teranishi M, Saitoh M, Yoshii M, Inada H, Ohta S, Akashi M, Minami J, Ono H, Ohrai M, Matsuoka H. Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2002;16(11):789-93.
30. Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(1 Pt 1):134-46.
31. Maltais I, Bachvarova M, Maheux P, Perron P, Marceau F, Bachvarov D. Bradykinin B2 receptor gene polymorphism is associated with altered urinary albumin/creatinine values in diabetic patients. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80(4):323-7.
32. Kaye DM, Smirk B, Williams C, Jennings G, Esler M, Holst D. Beta-adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. *Pharmacogenetics* 2003;13(7):379-82.
33. Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NH, Williams GH. Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002;39(2):191-6.

34. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(6):938-45.
35. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(7):361-8.
36. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20(6):1433.
37. Fernandez-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert L. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in essential hypertension: relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 1998;11(4 Pt 1):439-44.
38. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235-->Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 1993;2(5):609-10.
39. Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens* 1997;15(12 Pt 1):1385-8.
40. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, White PC. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene

- polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* 1998;97(6):569-75.
41. Braun A, Kammerer S, Bohme E, Muller B, Roscher AA. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211(1):234-40.
 42. Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E. G-protein beta3 subunit and alpha-adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke* 2001;32(4):822-9.
 43. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32(3):521-6.
 44. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004;147(3):516-21.
 45. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993;3(2):120-1.
 46. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995;332(11):706-11.

47. Hingorani AD, Brown MJ. A simple molecular assay for the C1166 variant of the angiotensin II type 1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213(2):725-9.
48. Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. DNA polymorphisms and linkage disequilibrium in the angiotensinogen gene. *Hum Genet* 1996;98(2):194-8.
49. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation* 1994;90(5):2207-12.
50. Tiago AD, Badenhorst D, Skudicky D, Woodiwiss AJ, Candy GP, Brooksbank R, Sliwa K, Sareli P, Norton GR. An aldosterone synthase gene variant is associated with improvement in left ventricular ejection fraction in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2002;54(3):584-9.
51. Sanderson JE, Yu CM, Young RP, Shum IO, Wei S, Arumanayagam M, Woo KS. Influence of gene polymorphisms of the renin-angiotensin system on clinical outcome in heart failure among the Chinese. *Am Heart J* 1999;137(4 Pt 1):653-7.
52. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 1995;95(3):948-53.
53. Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, Metzger R, Hilgenfeldt U, Zimmermann F, Jacob H, Fuxe K, Ganten D, Kaling M. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *Embo J* 1992;11(3):821-7.

54. Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994;269(50):31334-7.
55. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71(1):169-80.
56. Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest* 1994;93(3):1285-7.
57. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Mikami H, Miki T, Ogihara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 1994;8(7):521-4.
58. Iwai N, Shimoike H, Ohmichi N, Kinoshita M. Angiotensinogen gene and blood pressure in the Japanese population. *Hypertension* 1995;25(4 Pt 2):688-93.
59. Borecki IB, Province MA, Ludwig EH, Ellison RC, Folsom AR, Heiss G, Lalouel JM, Higgins M, Rao DC. Associations of candidate loci angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme with severe hypertension: The NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol* 1997;7(1):13-21.
60. Wong KK, Summers KM, Burstow DJ, West MJ. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes in patterns of left ventricular hypertrophy and in diastolic dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22(6-7):438-40.

61. Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F, Hanrath P, Hoffmann R. Lack of association among five genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Am Heart J* 2001;141(4):671-6.
62. Kauma H, Ikaheimo M, Savolainen MJ, Kiema TR, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA. Variants of renin-angiotensin system genes and echocardiographic left ventricular mass. *Eur Heart J* 1998;19(7):1109-17.
63. Shlyakhto EV, Shwartz EI, Nefedova YB, Zukova AV, Vinnic TA, Conrady AO. Lack of association of the renin-angiotensin system genes polymorphisms and left ventricular hypertrophy in hypertension. *Blood Press* 2001;10(3):135-41.
64. Beige J, Zilch O, Hohenbleicher H, Ringel J, Kunz R, Distler A, Sharma AM. Genetic variants of the renin-angiotensin system and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 1997;15(5):503-8.
65. Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z, Psaty BM, Edwards KL, Siscovick DS, Kronmal RA, Nazar-Stewart V. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens* 2002;15(12):1050-6.
66. Schut AF, Bleumink GS, Stricker BH, Hofman A, Witteman JC, Pols HA, Deckers JW, Deinum J, van Duijn CM. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of heart failure in hypertensive subjects. *Eur Heart J* 2004;25(23):2143-8.
67. Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, Chagnon YC, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. AGT M235T and ACE ID polymorphisms

- and exercise blood pressure in the HERITAGE Family Study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(1):H368-74.
68. Andersson B, Sylven C. The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28(1):162-7.

Épilogue

Cette étude suggère qu'il existe un lien entre certains polymorphismes génétiques du SRAA et la prédisposition à l'IC, notamment au niveau du gène codant pour l'AGT. Il est intéressant de noter que, malgré le grand intérêt porté au gène codant pour ECA dans la dernière décennie, le polymorphisme I/D de ce dernier, lorsque analysé tout seul, n'est pas ressorti comme facteur de risque de cette maladie. Par contre, dans une analyse de combinaison avec le gène codant pour l'AGT, un certain lien de causalité fût perçu. Nous allons aborder ce point dans la prochaine étude de cette thèse, où la notion du temps, dont plus précisément de l'âge du patient, vient jouer un rôle prééminent dans la compréhension des influences qu'ont les variantes génétiques dans la relation cause-maladie.

CHAPITRE III

**Increased risk of myocardial infarction associated with angiotensin-converting
enzyme gene polymorphism is age-dependent.**

publié dans:

Journal of Clinical Pharmacology

2010, Dec 8 [epub ahead of print]

Increased risk of myocardial infarction associated with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is age-dependent.

Bettina A. Hamelin, Pharm.D, Ph.D¹

Marcin Zakrzewski-Jakubiak*, M.Sc²

N. Michelle Robitaille, M.D.¹

Peter Bogaty, M.D.¹

Line Labbé, Ph.D²

Jacques Turgeon, Ph.D²

* submitting author:

Institution:

¹Quebec Heart Institute, 2725 chemin Sainte-Foy, G1V 4G5, Québec, Canada.

²University of Montreal, Faculty of Pharmacy, 2950 chemin de la Polytechnique, H3T 1J4, Montréal, Canada.

Corresponding author:

Jacques Turgeon, Ph.D

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,

Hôtel-Dieu, pavillon Masson

3850, Saint-Urbain, room 8-213

Montréal (Québec) H2W 1T7

Keywords: myocardial infarction, polymorphism, ACE I/D, age-dependent.

Préambule

Tout comme pour le domaine de l'IM, les grandes études cliniques en IC ont façonné la prise en charge pharmacothérapeutique de cette maladie. Puisque ces études comparaient un traitement actif à un traitement contrôle, l'aspect le plus important était que ces deux groupes soient identiques afin d'éviter la présence d'une variable confondante inégalement distribuée. Conséquemment, appariement pour l'âge fut crucial lors de la réalisation de ces études. À l'inverse, et pour souligner un des aspects notés dans la section 2.0 de cette thèse, cette pratique n'est pas nécessaire, et peut entraîner des biais, lors d'études évaluant des variantes génétiques comme facteurs de prédisposition à une maladie. La raison majeure est le risque d'introduire des erreurs de classification lors d'un appariement pour l'âge, puisque la maladie en question pourrait être déjà présente chez ces sujets contrôles, sans s'être encore manifestée ouvertement. Dans l'étude ci-présente, nous pouvons apprécier un tel scénario, où le groupe contrôle est constitué de sujets jeunes, sans maladie cardiovasculaire. Il est évident qu'une certaine fraction de ces sujets sera affectée de cette maladie dans le futur et qu'une certaine tolérance à l'erreur de classification est inévitable. Par contre, l'évaluation d'un tel échantillon procure la vraie fréquence allélique/génotypique populationnelle d'un polymorphisme, à l'inverse de ce qui est prétendu par des études appariant leur groupe contrôle pour l'âge du groupe actif.

Résumé

Le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est un locus génétique candidat pour la maladie coronarienne. Puisque les études sur la relation entre le polymorphisme I/D du ACE et l'infarctus du myocarde (IM) ont été contradictoires, nous avons supposé que l'âge peut être un facteur de modulation important dans cette relation. La distribution allélique et génotypique a été déterminée dans trois groupes distincts: 104 hommes avec un premier IM à un jeune âge (≤ 45 ans), 271 jeunes hommes sains (≤ 30 ans) et 28 hommes âgés en bonne santé (> 65 ans). Tous les participants étaient des descendants français provenant de la ville de Québec, Canada.

La distribution des fréquences allélique et génotypique du polymorphisme I/D du gène ACE a été similaire chez les jeunes en bonne santé, les personnes âgées en bonne santé et les patients avec un IM en jeune âge ($P > 0,05$). Toutefois, lorsque l'âge au moment de l'IM a été pris en considération (≤ 40 , ≤ 35 ou ≤ 30 ans), un effet âge-dépendant significatif a été décelé en association avec la prévalence du génotype DD. Comparativement au groupe des jeunes en bonne santé, cette prévalence a augmenté de 22%, 61 % et 157% au fur et à mesure que l'âge comparatif diminuait ($P < 0,05$). Des observations similaires ont été obtenues par rapport aux hommes âgés en bonne santé ($P < 0,05$). Selon ces données, le polymorphisme I/D du gène ACE semble être un facteur de risque génétique pour l'IM chez les jeunes hommes et devient un modulateur important du risque d'IM à un jeune âge.

Abstract

Background: The angiotensin-converting enzyme (ACE) gene is a candidate genetic locus for coronary artery disease (CAD). Studies investigating the relationship between the ACE-I/D gene polymorphism and myocardial infarction (MI) have been inconsistent. We hypothesized that age may be an important modulating factor in this relationship.

Methods: ACE-I/D allele and genotype distribution was determined in three groups: 104 men with a first MI at a young age (≤ 45 years old); 271 healthy young men (≤ 30 years old) and 28 healthy elderly men (> 65 years old). All participants were French descendants from Quebec-City, Canada.

Results: Frequency distribution of the ACE alleles and genotypes were similar among the healthy young, the healthy elderly and the MI patients ($P > 0.05$). However, when considering the age at the time of the MI (≤ 40 , ≤ 35 or ≤ 30 years old), a significant age-dependent effect with the prevalence of the ACE-DD genotype was found, as it increased by 22%, 61% and 157%, respectively, compared to the healthy young group ($P < 0.05$). Similar observations were obtained versus the healthy elderly men ($P < 0.05$).

Conclusion: The ACE-I/D polymorphism seems to be a genetic risk factor for MI in young men and becomes an important modulator of MI risk at a young age.

1. Introduction

Coronary artery disease (CAD) is the leading cause of death in the Western populations. Its risk factors are both modifiable (smoking, hypertension, etc.) and unmodifiable (age, gender, genetic background).[1] Increasing emphasis has been placed on the genetic determinants of cardiovascular disease in order to elucidate why many subjects without the typical « classic » risk factors develop premature cardiovascular disease.[2,3]

The angiotensin converting enzyme (ACE) is a key element of the renin-angiotensin-aldosterone and the kallikrein-kinin systems. In plasma, on the endothelial cell surface and in various tissues, ACE converts the inactive angiotensin I to angiotensin II and inactivates the vasodilator bradykinin.[4,5] It is now believed that local production of angiotensin II plays a pathological role in vascular biology.[6-10] Consequently, ACE inhibitors have received great attention for their potential antiatherogenic effects [11-13] as well as shown a reduction in the incidence of fatal and nonfatal myocardial infarction (MI).[14,15] Furthermore, the clinical benefits of ACE inhibitors include also patients at their earlier stages of heart disease.[16]

ACE activity varies between individuals and the ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism accounts for approximately 30% of this interindividual serum ACE variability.[17,18] Homozygotes for the deletion (ACE-DD) have a 2-fold higher plasma ACE activity when compared against homozygotes for the insertion (ACE-II), while heterozygotes have intermediate enzyme activities.[18] The discovery of this polymorphism raised the exciting possibility that a genetic variation in or near the ACE

gene locus may be a pathogenic determinant for CAD. Indeed, the ACE-DD genotype was associated with an increased risk for European men to develop a MI.[19-22] In contrast, two large studies did not find an association between this genotype and MI or ischemic heart disease in general [23,24], tempering initial enthusiasm that a major genetic determinant for the disease had been found. Nonetheless, subsequently Anderson et al.[25] and Espinosa et al.[26] both found a modest link between the ACE DD genotype and MI in women and in a Spanish population, respectively. Ultimately, two meta-analyses concluded that the DD-genotype generally confers a 10% increased risk of MI and that this increased risk could escalate to as high as 150% in Japanese populations.[27,28]

The influence that the ACE DD genetic variance imparts on the risk for a MI is not absolute, but rather relative, when other covariates are taken into account. For example, in the ECTIM study, odds ratio for MI in patients with the DD genotype compared to those with the ID or the II genotype was 1.34.[19] However, in that same study, patients deemed at low risk for a MI, based on certain traditional risk factors for arteriosclerosis, had a much higher odds ratio of 3.2.[19] Hence, based on the findings of that study, the importance of the ACE I/D polymorphism as a risk factor for a MI could be viewed in two different ways. Either it is erratic and hard to predict or, as we assume, it is subtle and diluted in the mass of the other classic cardiovascular risk factors, which renders its detection rather difficult. Consequently, the risk that the ACE I/D polymorphism imparts on having a MI may become very important when those stronger risk factors are not present to impede with its detection. Assuming the latter, we speculated that age at the time of a first coronary event might be a crucial covariate in studies assessing the role of

gene mutations in the development of CAD. We hypothesized that genetic polymorphisms may be prominent predictors of CAD or MI particularly early in life, at which point the traditional risk factors would have not yet had the time to cause sufficient cardiovascular damage to trigger a cardiovascular event. Therefore, if such an event occurred early in life, the magnitude of importance imparted from all the possible risk factors would be shifted towards the genetic polymorphisms. Therefore, the objective for the current study was threefold. Firstly, we aimed to investigate the prevalence of ACE I/D genotypes among men of a French ancestry living in the Quebec City area who presented with a first MI at 45 years of age or less. Secondly, we proposed to compare this ACE I/D genotype distribution with that determined in two independent groups: the first being a cohort of young (≤ 30 years old) healthy men which allowed us to reflect and establish the overall baseline allele and genotype frequencies in the French fraction of the Quebec population *prior to* the clinical manifestation of CAD and the second, a cohort of healthy older than 65 years of age men without a personal history of CAD that allowed the determination of allele and genotype frequencies in individuals who did not developed CAD at a young age (i.e. at ≤ 45 years old). Lastly, we intended to determine whether the ACE I/D gene polymorphism could modulate the time of a first clinically manifested coronary event.

2. Methods

2.1. Study Design

This was a controlled study investigating the distribution of the ACE DD, I/D and II genotype frequencies among young French-descending men who experienced a MI at ≤ 45 years of age. That genotype distribution was then compared to two healthy groups (≤ 30 years old and > 65 years old) also of French ancestry and without a known personal history of CAD.

2.2 Study Population

The patient population was drawn from the cardiac patient pool followed at the Laval Hospital, Ste-Foy, Quebec, Canada. All the men who had sustained and survived a first MI at the age of 45 years or less were recruited to participate in this study on a voluntary basis. Age of ≤ 45 years at the time of a documented MI, male sex, to be of French extraction and to provide a written consent form were the only criteria for inclusion into the study. Diagnosis of MI was established by chart review and was based on (1) characteristic chest pain lasting for at least 20 minutes, (2) typical Q wave changes and/or (3) elevation of the creatine kinase MB isoenzyme fraction. Healthy young men (≤ 30 years old) were recruited in equal proportions among Laval University students and among non-university affiliated individuals. Healthy elderly men (> 65 years old) were recruited at local retirement homes. All those subjects were recruited only if they had no personal history of clinically documented cardiovascular disease. Recreational drug users

were excluded while cigarette smokers were not. The study complies with the Declaration of Helsinki, was approved by the Laval Hospital Ethics Committee and all participants gave written informed consent prior to their inclusion into the study.

2.3 Genomic DNA extraction and genotyping of the ACE gene polymorphism

A 10 mL sample of whole blood was collected in EDTA collection tubes for DNA isolation. Determination of the ACE-I/D polymorphism was performed by polymerase chain reaction as previously described.[17,29] The polymerase chain reaction (PCR) product was a 190 bp fragment in the absence of the insertion and a 490 bp fragment in the presence of the insertion.[29] Dimethylsulphoxide (5%) was added to all PCR reactions to assure amplification of the insertion allele in heterozygotes and therefore avoid misclassification of approximately 5% of ID heterozygotes as DD homozygotes.[30] In addition, all samples classified as DD homozygotes were tested with an additional insertion specific amplification reaction.[23] This reaction yields a 335 bp amplicon only in the presence of the I allele, while no product is amplified in the true DD homozygotes.[23]

2.4 Clinical data collection

Patient hospital charts were reviewed for age, systolic and diastolic blood pressure, plasma lipid levels, family history of premature CAD, treatment of hypertension and/or hyperlipidemia and smoking status at the time of the MI.

2.5 Statistical analysis

To test for Hardy-Weinberg equilibrium, the expected genotype frequencies were calculated from the allele frequencies and deviation from the observed genotype frequencies was determined using the chi-square (χ^2) analysis. We used a logistic regression analysis in which the history of MI was the dependent variable and assessed the independent effect of the ACE genotype while other measured variables were entered as independent variables. Clinical variables were compared between groups by analysis of variance (ANOVA). All statistical computations were performed using the SAS® (Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, N.C.) software.

3. Results

One hundred and four male, ≤ 45 years old, MI patients (mean age 38 ± 4 years), 271 healthy young men (≤ 30 years old; mean age 25 ± 4 years) and 28 healthy elderly men (> 65 years old; mean age 76 ± 6 years) participated in the study.

The frequency distribution of the ACE I/D genotypes for these individuals are summarized in Table 1. Among the young and the elderly healthy men, the frequencies of the deletion allele (D) were 0.542 and 0.446, respectively ($P=0.205$ for young vs. elderly). These frequencies were similar to that of the MI patients, when the MI population was considered as a whole ($n = 104$; D allele frequency of 0.586; $P=0.287$ vs. healthy young; $P=0.070$ vs. healthy elderly). However, the frequency of the D allele increased as age at the time of myocardial infarction decreased. At its apogee, the D allele frequency was of 0.875 among individuals who experienced their first infarct at an extremely young age of ≤ 30 years of age ($P=0.009$ vs healthy young and $P=0.004$ vs. healthy elderly).

The frequencies of the DD, I/D, and II genotypes among the young and the elderly healthy men were 0.292, 0.502, 0.206, and 0.214, 0.464, 0.321, respectively. These genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium and were not statistically different ($P=0.347$). Among the MI patients ($n=104$), the frequency of these genotypes was 0.327, 0.519 and 0.154, respectively. These data indicate that, without considering age at the time of the infarction, the frequency of the DD genotype among all patients suffering a MI at ≤ 45 years of age was not different from that of either healthy young ($P=0.491$) or healthy elderly ($P=0.122$) men. In contrast, when age was included as a

confounding factor in the risk of MI calculation, it became evident that there was an age-dependent effect ($P<0.041$; logistic regression analysis) (Figure 1): at ≤ 40 years of age the prevalence of ACE-DD was 0.356 (22% increase compared to young volunteers ; $P=0.135$), at ≤ 35 years of age its prevalence was 0.469 (61% increase compared to young volunteers ; $P=0.141$) and at ≤ 30 years of age its prevalence was 0.750 (157% increase compared to young volunteers ; $P=0.026$). In the latter group, a marked shift of genotypes toward DD homozygotes and an absence of II homozygotes was observed. Similar observations were made when establishing age-dependence of ACE-DD prevalence in MI patients using the healthy elderly men as the comparator ($P=0.037$, 0.064 and 0.018 for MI patients ≤ 40 , ≤ 35 and ≤ 30 years of age, respectively).

Among the MI patients, there was no difference in any of the evaluated clinical parameters between the three genotype groups (Table 2; all $P>0.05$). Because cholesterol levels are affected by ischemic events, lipid levels were considered in the analysis only if documented prior to or determined at least 8 weeks after the MI. The prevalence of smokers was very high among these MI patients (approximately 80%), but similar in the three genotype subgroups. Young men included in our study were generally at less traditional risk for ischemic heart disease ($P<0.05$ for total cholesterol, LDL cholesterol and percent smokers vs. ≤ 45 years old MI patients) (Table 3).

4. Discussion

After the ACE polymorphism was recognized as a new genetic marker for cardiovascular disease,[19-21,31,32] two large studies received a lot of attention as they denied the existence of such a genetic risk relationship with MI and ischemic heart disease.[23,24] Consequently, it was argued that on the one hand the complex gene-environment interaction and on the other hand the occurrence of the ACE-DD genotype in about one third of the general population, may explain why a single gene by itself may not determine the risk of developing CAD in any population. This current study, conducted in a French-descending Quebec population, demonstrated that the ACE I/D allele and genotype distributions were similar to those observed in other European and North American populations.[19,21,33] The French speaking population around Quebec City is of stable and homogenous genetic background.

Our finding that the prevalence of the ACE-DD genotype was similar among the healthy young, the healthy elderly and the entire population of MI patients adds further support to studies of Lindpaintner *et al.* and Friedl *et al.* suggesting a lack of importance of the ACE I/D polymorphism in predicting MI risk at large.[23,24] Furthermore, others have also evaluated the influence of the ACE-DD genotype on MI manifestation in younger (≤ 55 years old) patients. Although Cambien *et al.* [21] found that plasma ACE level was higher in MI patients than in control subjects only in the younger age group (≤ 55 years), this divergence was not associated with the ACE I/D polymorphism. Correspondingly, the authors excluded this polymorphism as an independent risk factor for MI in the young. Similarly, Keavney *et al.* [28] did not find any association between

the ACE I/D locus and risk for MI in his cohort of young individuals (30-54 years old for men, 30-64 years old for women). Using the same approach, by combining all the young MI patients into a single group (≤ 45 years old), we have obtained comparable results, since the frequency distribution of the ACE alleles and genotypes were similar among the healthy young, the healthy elderly and the MI patients. It is only upon age-stratification that we were able to recognize the impact of the ACE I/D polymorphism as a risk factor for MI in young patients.

Hence, our observation that the prevalence of the ACE-DD genotype increased significantly in men as the age at the time of the myocardial infarction decreased supports the hypothesis that coronary risk explained by the ACE polymorphism is age-dependent. There is no discrepancy between our observations and those of Lindpaintner *et al.* and Friedl *et al.*, since the mean age of patients in their studies was approximately 60 years old.[23,24] By analyzing the population of MI patients according to their age group, we were able to establish an inverse age-dependent effect of the ACE-DD genotype on MI manifestation.

Groups were carefully selected for comparison in this study in order to address potential pitfalls associated with age-matched controls. First, the ACE I/D genotype distribution was established in a cohort of young men (18-30 years old) without a personal history of CAD. The ACE I/D genotype distribution determined in this population is thought to reflect the overall I/D allele and genotype baseline distributions in the French-descending Quebec population. Second, we studied healthy elderly men at a mean age of 76 ± 6 years that had never developed symptomatic CAD. The healthy elderly control group was not age-matched to the MI patients, since in individuals

deemed to be disease-free, CAD may exist and be clinically manifested later on, leading to misclassification errors and dilution of the gene effect. As such, the use of an age-matched control group would weaken its association with CAD. We believe that a healthy elderly group (>65 years old) represents better a CAD-free population than would an age-matched control group (<45 years old), since these men do not manifest clinical CAD even at a much later point in time, and hence are not thought to introduce misclassification errors. Thus, allele and genotype distributions determined in our groups of healthy men suggest that the increase in ACE-DD genotype observed in the MI patients has a potential causal relationship.

In addition, clinical profiles were similar in all three genotype groups of MI patients ($P>0.05$; Table 2) suggesting independence of the ACE I/D genetic risk from known traditional risk factors. When calculating the cardiovascular disease risk profile based on the Framingham study, this group of young MI patients had at least twice the risk of developing CVD in the next 10 years when compared to an average, non-smoking, 45 years old man with normal blood pressure and normal HDL and total cholesterol levels.[34] Therefore, based on these assessments, it is less surprising that this group of men would suffer from a MI at such a young age. What is fascinating, it is mostly those that have the ACE DD genotype that are pooled out of the global population and indeed undergo a coronary event. Therefore, this finding demonstrates that the classical CAD risk factors do not seem to affect everyone equally. Furthermore, this effect is more predominant at younger ages and slowly wears off with time. As can be seen in figure 1, by the age of 45, there is no difference in the DD genotype frequency between the MI patients and our baseline group. That effect is explainable upon realization that at an

earlier age, say 30 years old, those classic risk factors have not yet had enough time to damage the coronary vasculature to the point of a coronary event. At this point, it is chiefly the patient's genetic background that forces an acute event. Eventually, some years after those classical risk factors have had time to accumulate their harmful effect, the genetic background's worth seems to be washed-off and diluted to the point that it is not longer possible to detect by the current methods.

Based on our findings, we believe that a MI at a young age is explained by the supplementary negative effect of the ACE DD genotype on top of other classical cardiovascular risk factors. Our MI patients were already at a substantial risk for CAD and the ACE DD genotype just pushed them over the "safety" threshold. On the other hand, the ACE DD genotype may act as a detrimental physiologic factor that is present since birth. Hence, similarly to other risk factors such as hypertension or atherosclerosis, that impart their damaging burden over time, this genotype might worsen the cardiovascular system in a timely fashion that ultimately leads to the index event.

We strongly believe that this gene polymorphism may qualify as an independent risk factor for MI at a young age. We hypothesize that age is the crucial modulating factor in this risk relationship, which, when not taken into consideration, makes this connection difficult to detect.

5. Conclusion

We studied the frequency distribution of the ACE I/D polymorphism genotypes of men having suffered from a MI at a young age (≤ 45 years), as well as of young and elderly healthy men. The prevalence of the ACE-DD genotype increased significantly among the MI patients, as compared to our healthy groups, when the MI occurred at ≤ 40 , ≤ 35 and ≤ 30 years of age. According to our results, the ACE-DD genotype seems to be a marker of MI risk in men and especially gains in importance when the MI occurs at a younger age. This may clarify the current debate on the impact of the ACE I/D polymorphism on CAD risk and has important clinical implications for the identification of potential young MI candidates. An appropriate preventative approach might attenuate, in selected individuals, the additive damaging effects of genetic and traditional modifiable risk factors.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) & Heart and Stroke Foundation of Canada. Bettina A. Hamelin was a recipient of a Research Scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. Line Labbé was a recipient of a Studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors thank Jimmy Rail, M.Sc., Marie-Josée Asselin, M.Sc., Chantal Gauvin, M.Sc and Esther Pouliot for technical assistance, Martine Genest, R.N. and Vicky Falardeau, R.N. for the coordination of the study and Serge Simard, M.Sc. for statistical analysis of the data.

Duality of Interest

BH has no conflict of interest to declare. MZ has no conflict of interest to declare. MR has no conflict of interest to declare. PB has no conflict of interest to declare. LL has no conflict of interest to declare. CG has no conflict of interest to declare. JT has no conflict of interest to declare.

Table Legends

Table 1: Frequency distribution of the angiotensin-converting enzyme I/D alleles and genotypes from the two healthy men groups and the 104 men who had sustained a first myocardial infarction at ≤ 45 years of age.

Table 2: Clinical data according to ACE genotypes of the patients that experienced a myocardial infarction at ≤ 45 years of age.

Table 3: Clinical data of the healthy young men.

Table 1. Frequency distribution of the angiotensin-converting enzyme I/D alleles and genotypes from the two healthy men groups and the 104 men who had sustained a first myocardial infarction at ≤ 45 years of age.

	Subjects	Allele frequency		Genotype distribution		
	n	D	I	DD	ID	II
Healthy						
(≤ 30 years)	271	0.542	0.458	0.292	0.502	0.206
(>65 years)	28	0.446	0.554	0.214	0.464	0.321
MI patients						
≤ 45 years old	104	0.586	0.413	0.327	0.519	0.154
≤ 40 years old	73	0.623	0.377	0.356	0.534	0.109
≤ 35 years old	32	0.672	0.328	0.469	0.406	0.125
≤ 30 years old	8	0.875	0.125	0.750	0.250	-

Table 2. Clinical data according to ACE genotypes of the patients that experienced a myocardial infarction at ≤ 45 years of age.

Risk factors	ACE-DD	ACE-ID	ACE-II
Age (years)	37 \pm 5 (25 - 45)	38 \pm 4 (27 - 45)	40 \pm 4 (33 - 45)
SBP (mm Hg)	120 \pm 14 (93 - 150)	121 \pm 15 (100 - 165)	129 \pm 20 (90 - 160)
DBP (mm Hg)	78 \pm 12 (43 - 100)	77 \pm 8 (60 - 100)	76 \pm 14 (60 - 100)
Fasting Glycemia (mmol/L)	6.0 \pm 2.3 (2.1 - 14.0)	6.0 \pm 1.7 (3.6 - 12.2)	5.9 \pm 2.8 (4.3 - 14.2)
Cholesterol (mmol/L)	5.9 \pm 1.0 (4.3 - 7.7)	5.9 \pm 0.9 (4.2 - 7.7)	5.8 \pm 0.9 (4.6 - 7.6)
HDL (mmol/L)	0.9 \pm 0.2 (0.6 - 1.4)	0.9 \pm 0.2 (0.6 - 1.4)	0.8 \pm 0.2 (0.6 - 1.2)
LDL (mmol/L)	3.7 \pm 0.7 (2.4 - 5.2)	4.2 \pm 0.8 (2.8 - 5.7)	4.2 \pm 0.7 (3.6 - 5.4)
Triglycerides (mmol/L)	2.3 \pm 1.4 (1.0 - 5.8)	2.0 \pm 1.0 (1.1 - 5.2)	2.4 \pm 1.0 (1.4 - 4.5)
Family history of cardiac disease	56	59	69
Smokers	80	72	81
Ex-smoker*	9	13	6
Daily cigarette consumption	27 \pm 14 (5-60)	27 \pm 11 (2-60)	28 \pm 13 (15-60)

Data presented as mean \pm SD (range) or as percentage.

* Ex-smokers were defined as individuals who had stopped smoking at least one year prior to their infarction

Table 3. Clinical data of the healthy young men.

Risk factors	Healthy young men (n=271)
Age (years)	25±4 (18-30)
SBP (mm Hg)	120±14 (90-165) ¹
DBP (mm Hg)	77±9 (60-102) ¹
Cholesterol (mmol/L)	4.2±0.8 (2.7-6.2) ^{2,3}
HDL (mmol/L)	1.0±0.2 (0.9-1.4) ⁴
LDL (mmol/L)	2.6±0.8 (1.1-4.6) ^{3,4}
Triglycerides (mmol/L)	1.5±0.6 (0.7-2.6) ²
Smokers	32 ³

Data presented as mean ± SD (range) or as percentage.

¹ n=155 ;

² n=18 ;

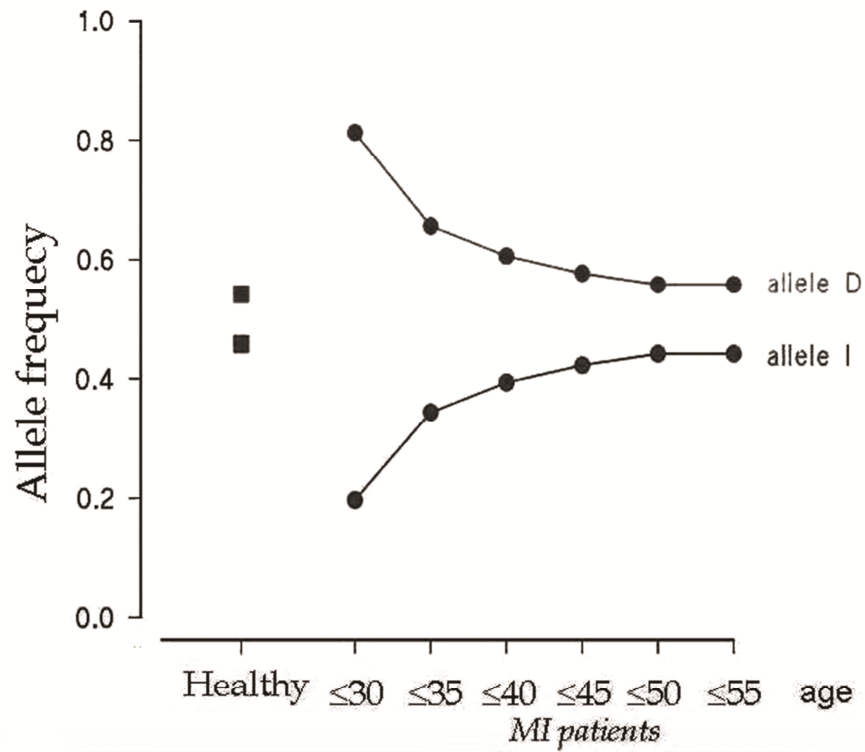
³ *P*<0.05 compared to MI patient

⁴ n=16

Figure Legends

Figure 1: Age-dependent change in the frequency distribution of the ACE I/D alleles among young MI patients.

Figure 1: Age-dependent change in the frequency distribution of the ACE I/D alleles among young MI patients.



*Graphical representation of the healthy group is based on the healthy young men (≤ 30 years old) (total $n=271$)

References

- [1] Talbert RL. Ischemic Heart Disease; In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC (eds): Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. 6th edition. New York, Elsevier, 2005, pp 219-250.
- [2] Caulfield M, Newell-Price J. The angiotensin converting enzyme gene in cardiovascular disease. *Br Heart J* 1995;74:207-8.
- [3] Raynolds MV, Perryman MB. The association between the angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and cardiovascular disease. *Coron Artery Dis* 1995;6:302-9.
- [4] Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme. *Circ Res* 1975;36:247-55.
- [5] Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977;57:313-70.
- [6] Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Intern Med* 1993;153:937-42.
- [7] Dzau VJ. Vascular renin-angiotensin system and vascular protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 5:S1-9.
- [8] Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991;9:3-15.
- [9] Hanna IR, Taniyama Y, Szocs K, Rocic P, Griendling KK. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:899-914.

- [10] Schulman IH, Zhou MS, Raij L. Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis. *Curr Hypertens Rep* 2005;7:61-7.
- [11] Powell JS, Clozel JP, Muller RK et al. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989;245:186-8.
- [12] Aberg G, Ferrer P. Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15 Suppl 5:S65-72.
- [13] Rakugi H, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE. Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation* 1994;90:449-455.
- [14] Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al, on behalf of the SAVE Investigators. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992;327:669-77.
- [15] The SOLVD Investigattors. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med* 1992;327:685-91.
- [16] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-153.
- [17] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene

- accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-1346.
- [18] Tired L, Rigat B, Visvikis S et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.
- [19] Cambien F, Poirier O, Lecerf L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
- [20] Tired L, Ducimetiere P, Bonnardeaux A et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994;344:910-3.
- [21] Cambien F, Costerousse O, Tired L et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:669-76.
- [22] Fujisawa T, Ikegami H, Shen GQ et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM. *Diabetes Care* 1995;18:983-5.
- [23] Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995;332:706-11.
- [24] Friedl W, Krempler F, Paulweber B, Pichler M, Sandhofer F. A deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is not associated with

- coronary heart disease in an Austrian population. *Atherosclerosis* 1995;112:137-143.
- [25] Anderson JL, Carlquist JF, King GJ et al. Angiotensin-converting enzyme genotypes and risk for myocardial infarction in women. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:790-6.
- [26] Espinosa JS, Rueda E, Munoz E et al. Association between myocardial infarction and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in young patients. *Med Clin (Barc)* 1998;110:488-91.
- [27] Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:708-712.
- [28] Keavney B, McKenzie C, Parish S et al. Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *Lancet* 2000;355:434-42.
- [29] Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433.
- [30] Fogarty DG, Maxwell AP, Doherty CC, Hughes AE, Nevin NC. ACE gene typing. *Lancet* 1994;343:851.
- [31] Zhao Y HJ, Kamitani A, Miki T, Mikami H, Ogihara T. Significance of deletion polymorphism of the ACE gene as a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *J Hypertens* 1994;12:S71.

- [32] Ruiz J, Blanche H, Cohen Net al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:3662-5.
- [33] Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. Lancet 1993;342:1085-1086.
- [34] Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. Am Heart J 1991;121:293-298.

Épilogue

La prépondérance de l'allèle D du polymorphisme ACE I/D chez les très jeunes patients atteints d'un IM, ainsi que la perte de sa valeur significative au fur et à mesure que l'âge lors de cet événement augmentait, corrobore partiellement avec l'élaboration de l'objectif général #2 de cette thèse. La première notion à aborder à ce sujet est celle de la pénétrance d'une variante génétique. Puisque certains individus porteurs de l'allèle ou du génotype putatif ne développent pas de maladie, nous sommes en présence d'une pénétrance incomplète. Par contre, puisque la présence de la maladie est grandement et significativement rattachée à la présence de cette variante, mais seulement à un jeune âge, la notion de pénétrance conditionnelle doit alors être convoitée. Selon ce terme, certaines conditions doivent être pré-remplies pour que l'influence de la variante génétique puisse se faire sentir, et ce selon une pénétrance subséquente qui n'est pas nécessairement de 100%. Pour résumer, si les conditions sont remplies et qu'un individu a la malchance de subir la pénétrance de la variante génétique, il aura aussitôt la maladie, ce qui se produirait à un jeune âge. À l'inverse, si les conditions ne sont pas remplies ou que la variante n'est pas pénétrante, la présence des autres facteurs de risque de la maladie prédominera sur l'apparition de la maladie, et ce à un âge plus tardif.

Deuxièmement, nous avons déjà émis notre opinion face à l'importance de composer le groupe contrôle de sujets sains et jeunes pour éviter des biais de classification. Mais au-delà de la présence de ce premier groupe contrôle, le lecteur peut sûrement apprécier l'ajout d'un deuxième groupe contrôle composé de sujets beaucoup plus âgés que ceux évalués dans le groupe actif. Même s'il n'est pas exclu qu'une certaine

fraction de ces sujets puisse encore subir un événement cardiovasculaire, une certaine logique dicte qu'à l'âge qu'ils ont, s'ils ne l'ont pas encore subi, ce risque est plutôt faible. Pour faire suite, comme les deux groupes contrôles se distinguent conjointement du groupe actif au niveau du polymorphisme évalué, leur présence concomitante procure un contraste supplémentaire donnant du poids aux résultats présentés.

Et finalement, en lien avec la première étude de cette thèse, l'aspect décroissant de la prévalence de l'allèle D au fur et à mesure que l'âge du patient atteint d'un IM augmente, solde l'intérêt d'évaluer cette variante dans une maladie subséquente comme l'IC. En effet, dans la première étude de cette thèse, l'allèle D de l'ECA ne s'est pas démarqué comme un facteur de risque de l'IC. Par contre, suite aux résultats de cette deuxième étude, l'allèle D de l'ECA semble être un facteur de risque de l'IM, quoique seulement à un jeune âge, qui à son tour est un facteur de risque majeur de l'IC. Par extension, nous pouvons penser qu'indirectement l'allèle D joue un rôle dans la prédisposition à l'IC, du moins dans une petite fraction de la population. Conséquemment, l'observation de résultats positifs lors des études évaluant justement cette variante génétique chez des patients atteints d'IC repose quasiment d'un jeu de chance statistique, ce qui expliquerait les résultats divergents à ce sujet dans la littérature. Cette notion très intéressante et provocatrice devrait être évidemment étudiée chez d'autres facteurs de risque de l'IC avant de la généraliser. Par contre, comme l'IM est un facteur de risque majeur de l'IC, l'idée que nous soutenons ici détient beaucoup de poids.

CHAPITRE IV

Two adrenergic receptor polymorphisms affect the hemodynamic response to carvedilol in stable heart failure patients.

soumis pour publication dans:

Journal of Clinical Pharmacology

2010

Two adrenergic receptor polymorphisms affect the hemodynamic response to carvedilol in stable heart failure patients.

Running title: Pharmacogenetics of carvedilol in heart failure.

Marcin Zakrzewski-Jakubiak, M.Sc.^{1,2}, Simon de Denu, Ph.D.^{2,3}, Marie-Hélène Leblanc, MD⁴, Michel White, MD³, Jacques Turgeon, Ph.D.^{1,2}

Institution:

¹ Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), pavillon Masson, 3850 rue Saint-Urbain, H2W 1T7, Montréal, Canada.

² Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, pavillon Jean-Coutu, 2950 chemin de la Polytechnique, H3T 1J4, Montréal, Canada.

³ Institut de Cardiologie de Montréal, Département de Recherche, 5000 rue Bélanger, H1T 1C8, Montréal, Canada.

⁴ Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, 2725 chemin Sainte-Foy, G1V 4G5, Québec, Canada.

Corresponding Author:

Dr. Jacques Turgeon, Ph.D

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu, Masson Pavilion
3850, St. Urbain street, Montréal (Québec) H2W 1T7, room 8-107

Financial Support was provided by the Canadian Institute for Health Research and by the Heart & Stroke Foundation of Canada.

Préambule

Suite aux analyses de prédisposition génétique abordées précédemment relatant le rôle des variantes génétiques dans la relation cause-maladie, les deux options d'évaluations subséquentes possibles étaient de, soit étudier l'impact de variantes génétiques sur la modulation de la progression pathologique de l'IC, soit d'évaluer la pharmacogénétique reliée à cette maladie. Puisque la première possibilité nécessiterait une étude s'étalant sur une longue période de temps afin de pouvoir capter des issues cliniques pertinentes, ce qui serait irréaliste dans le contexte d'études doctorales, nous avons opté de nous tourner vers la deuxième possibilité et d'évaluer l'influence de variantes génétiques des gènes candidats de la pharmacologie d'un β -bloqueur dans une population de patients atteints d'IC. Nous avons ainsi abordé une deuxième relation de celles présentées à la section 2.0, soit celle du traitement-cause. Comme notre choix de médicament fut le carvedilol, l'étude ici-discutée évalue les polymorphismes de gènes codant pour les cibles pharmacologiques de celui-ci.

Résumé

Cette étude avait pour but de vérifier si divers polymorphismes des récepteurs β - et α -adrénergiques influencent la réponse du carvédilol dans l'insuffisance cardiaque (IC). Des patients en IC stable ont cessé leur traitement β -bloquant pendant 24 heures afin de permettre l'établissement de leur profile de base hémodynamique (fréquence cardiaque (FC), pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD)). Par la suite, leur dose habituelle de carvédilol fût rétablie.

Nous avons recruté 59 patients caucasiens. Le carvédilol a diminué la FC (3.7bpm, $p < 1E-9$) et la PAS (5.1mmHg, $p < 0,0001$) deux heures après son administration. Par contre, nous avons observé une divergence dans cette réduction de la FC au sein du génotype B1-ADR, où les homozygotes Ser49 avaient une diminution de 4.5 battements par minute (bpm) et les porteurs de l'allèle Gly49, de seulement 0.6 bpm ($p = 0,001$). De plus, les porteurs de l'allèle de délétion (322-325) dans le gène A2c-ADR ont eu une augmentation moyenne de 2,4 et de 4.5 mmHg dans leur PAS et leur PAD, par rapport aux non-porteurs chez qui une diminution de 6,5 et 0.8mmHg a été observée, respectivement (les deux, $p < 0,05$).

Les polymorphismes du B1-ADR et du A2c-ADR peuvent jouer un rôle important dans la réponse hémodynamique du carvédilol chez les patients en IC stable.

Abstract

Aims:

This study tested whether various β - and α -adrenergic receptor polymorphisms are associated with carvedilol response in heart failure (HF).

Methods:

Stable HF patients withheld their β -blocker for 24 hours, their hemodynamic (heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP)) baseline profile was established and their usual carvedilol dose reinstituted.

Results:

We recruited 59 Caucasian patients. Carvedilol decreased the HR (3.7bpm, $p<1E-9$) and the SBP (5.1mmHg, $p<0.0001$) two hours post-dose intake. We observed a divergence in this HR reduction within the B1ADR genotype, where Ser49 homozygotes had a decrease of 4.5bpm and Gly49 carriers of only 0.6bpm ($p=0.001$). Furthermore, carriers of the (322-325) deletion in the A2cADR gene had a mean increase of 2.4 and 4.5mmHg, versus the non-carriers, who had a decrease of 6.5 and 0.8mmHg in their SBP and DBP, respectively (both, $p<0.05$).

Conclusion:

B1ADR and A2cADR polymorphisms may play an important role in the hemodynamic response to carvedilol in stable HF patients.

Keywords: carvedilol, heart failure, polymorphisms, beta-adrenergic receptor, alpha-adrenergic receptor.

1. Introduction

Heart failure (HF) is a major cause of morbidity and mortality in many countries throughout the world. Despite great health care progress in the last decade, HF accounts for more hospital admissions in patients older than 65 years old than any other illness and is currently the only cardiovascular condition that is increasing in incidence, prevalence and mortality [1]. Furthermore, with the presently ageing population and with better treatment and "salvage" of patients with acute myocardial infarctions (MIs) earlier in life, prevalence and disease burden are expected to continue to rise at least until 2025 [2, 3].

B-blockers are proven to decrease mortality in patients at any point during HF development [4]. Out of the many β -blockers available, only metoprolol succinate, bisoprolol and carvedilol have demonstrated to improve quality-of-life and hemodynamic measures, as well as lower mortality and hospitalisation rates [5-8]. However, the heterogeneity in response to β -blocker treatment is now being recognised and it is likely that genetic differences form a large component of intangibles that hold the answer to inter-patient variability.

Since β -blockers achieve their clinical effect by primarily antagonising the β_1 -adrenergic receptor (β_1 ADR), the candidate-gene approach mandated that focus be first shifted in uncovering its gene polymorphisms. Two common polymorphisms occur in the gene that encodes the β_1 ADR: an A→G substitution occurring at nucleotide 145 resulting

in a Ser to Gly substitution at codon 49, and a G→C substitution at nucleotide 1165 resulting in an Arg to Gly substitution at codon 389 [9]. However, third-generation β -blockers, such as carvedilol, also block the beta2-adrenergic receptors (β 2ADRs) and the α_{1A} -adrenergic receptors (α 1aADR) [10]. It is therefore of interest to establish if certain polymorphisms in those targets might also modulate the response to a β -blockade. With regards to the β 2ADR, population studies have revealed three common polymorphisms resulting in an amino acid substitution: an A→G substitution at nucleotide 46 resulting in an Arg to Gly substitution at codon 16, a C→G substitution at nucleotide 79 resulting in a Gln to Glu substitution at codon 27 and a C→T substitution at nucleotide 492 resulting in a Thr to Ile substitution at codon 164 [9]. Concerning the α 1aADR, the most functionally relevant gene polymorphism is the C→T substitution at nucleotide 1475, thereby causing the Arg to Cys transition at codon 347 (previously known as codon 492) [11].

Furthermore, the inter-patient variability seen with β -blockers may also be due to their ability to access the cardiac tissue to manifest their pharmacological action. Since medications access their respective tissue through the systemic circulation, genetic factors that regulate the bioavailability and metabolism of a drug may play a major role in a patient's response to its effects. Great interest is invested in the genetic polymorphism of CYP2D6 since approximately 30% of clinically used drugs are metabolised through this member of the cytochrome P450 family, carvedilol being one of them. Due to the extensive genetic polymorphism that influences its expression and function, where over 80 alleles and allele variants have been described, CYP2D6 shows a very high inter-individual variability [12].

In this study, we evaluated how certain adrenergic receptor polymorphisms affect the hemodynamic response to carvedilol, how certain CYP2D6 polymorphisms affect the pharmacokinetics of carvedilol and how the combined effect of the CYP2D6 and the adrenergic receptor polymorphisms interact in modulating carvedilol's action in stable HF patients.

2. Methods

2.1 Patient Population

The study population included Caucasian men and women with stable HF, all stemming from a French-Canadian background. Patients were included if they were ≥ 18 years of age, had a previously diagnosed stable HF that at the time of inclusion corresponded to the New York Heart Association Function Class (NYHA FC) I-III, had a documented left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 40\%$ by contrast ventriculography, radionuclide ventriculography or quantitative echocardiography within the previous year (for comparative statistical analysis, the most recent value was used), were treated with the same dose of carvedilol for at least one month, were in sinus rhythm (assessed by electrocardiogram, ECG, at the time of visit) and were born to French-Canadian parents, in order to avoid statistical bias introduced by differences in distribution of the gene polymorphisms in different populations.

Patients were excluded from the study if their participation or their current condition would either, not be able to procure usable clinical and statistically sound data, interfere with the gathering of parameters that were essential for the attainment of the main objectives or jeopardize their safety and well-being by following the study protocol. Explicitly, the exclusion criteria were: decompensated HF, stroke, MI, revascularization or hospitalization for cardiovascular reasons within the last 30 days; symptoms of HF at rest (NYHA FC IV); serum creatinine $\geq 250 \mu\text{mol/L}$; significant liver dysfunction

defined as an AST or ALT elevation > 3 times the upper limit of normal; active infection; corporal temperature $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$; active atrial fibrillation or other clinically significant supra-ventricular arrhythmia; already participating in an another trial with an active drug treatment or new device; administration of any investigational drug within the preceding 30 days; recipient of a heart transplant and inability to provide a signed consent form.

All participants provided written informed consent. The protocol was approved by the Montreal Heart Institute Scientific & Ethical Review Board. All study visits took place either in the Montreal Heart Institute (MHI) Research Center (Montreal, QC, Canada) or in the “Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec” Research Center (Québec, QC, Canada).

2.2 Study Protocol

The participants were instructed to withhold the intake of their last two carvedilol doses (1st on the evening before and 2nd on the morning of) before their visit at the research center; they were however allowed to continue their other medications. This translated into a carvedilol washout period of around 24 hours. Once at the research center, they were again screened for eligibility and certified that they still meet the inclusion and exclusion criteria.

First, a vascular access was established through the placement of a peripheral venous catheter. Patients were then lied down (referenced as time = x) for 15 minutes. At

the 15 and 20 minutes mark, a first hemodynamic profile was established, by measuring the patients' heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) and by recording an ECG reading (1st at $x + 15$ min., 2nd at $x + 20$ min.). Immediately following, three blood samples were taken (time = $x + 20$ min.) for pharmacokinetic studies (referred in text as pre-dose), for genotyping and for local laboratory analysis (electrolytes, liver function, renal function, NT-proBNP, etc). Immediately after, the participants took their usual carvedilol dose (referenced as time = y). The patients were then allowed to stay in the waiting area or in the research office for 90 minutes, where they were kept in a fasting state. Moderate water intake was allowed, however coffee or tea was prohibited. Patients were again lied down (time = $y + 90$ min.) for 15 minutes and the hemodynamic data as well as the ECG were repeated twice, at five minutes interval (1st at $y + 105$ min., 2nd at $y + 110$ min.). Immediately after, one blood sample was drawn (time = $y + 110$) for pharmacokinetic purposes (referred in text as post-dose).

2.3 Hemodynamic Measurements

HR, SBP, DBP and mean arterial pressure (MAP) were regarded as hemodynamic measurements in this study. The HR and the SBP/DBP recordings were taken from an ECG and an automatic arm cuff, respectively. MAP was calculated from the SBP and DBP values as follows: $(SBP + 2 \times DBP) / 3$. Those measurements were measured twice and at two different times by an experienced research nurse. The first measures were performed immediately before the patients' intake of their usual morning carvedilol dose.

The second measures were performed just short of 2 hours later, immediately before drawing the second blood sample for pharmacokinetic purposes. In both instances the recordings were averaged. These two time instances characterized the patient's hemodynamic response to carvedilol; the first after a "mini-washout" period of roughly 24 hours, the second at the expected peak carvedilol concentration. The patients were blinded to the results of their measurements in order to prevent any influence on the subsequent measures.

2.4 Pharmacokinetics & Carvedilol Enantiomer Quantification

Two 5ml blood samples for pharmacokinetic studies were drawn into EDTA-containing tubes. The blood samples were then subjected to plasma separation by centrifugation immediately following blood sampling. The resulting plasma sample was stored at -80°C until the carvedilol levels measurements were to be performed.

Plasma concentrations of carvedilol enantiomers were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection [13]. Briefly, 100 μl of NaOH (1M) and 30 μl of the internal standard (R(+)-propranolol, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in methanol) solution were added to 1ml of plasma. Plasma extraction was accomplished with 4ml of methyl tert-butyl ether, following a 20 minute long rotation (Reax2 rotator, Caframo, Wiarton, Canada) and a 5 minute centrifugation at 3400g on a Sorvall Legent RT centrifuge (Thermo©, Langenselbold, Germany). The organic phase was then transferred to a new tube and evaporated to dryness under nitrogen gas. The dry extract

was then dissolved in 80µl of acetonitrile containing triethylamine (0.5%) and 20µl of 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC) (3% in acetonitrile) and shaken for 10 minutes at room temperature in order to generate two diastereoisomers of carvedilol that would later allow for the quantification of the individual *R*(+)- and *S*(-)-carvedilol enantiomers (Figure 1). The solution was again evaporated to dryness under nitrogen gas. The dry residue was reconstituted with 200µl of the mobile phase (60:40 water:acetonitrile) and 20µl of this solution was injected onto the HPLC column.

2.5 Genotyping

A 4 ml blood sample was drawn into an EDTA-containing tube for genotyping purposes. The sample was stored at 4°C until DNA extraction using the GenElute Blood Genomic DNA Kit (NA2000 Sigma). DNA extraction was always performed within 7 days post blood sampling and the isolated DNA samples were stored at –20°C until the genotyping was carried out.

Genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and subsequent incubation with restriction fragment length polymorphism (RFLP) enzymes, if necessary, in accordance with protocols modified from previously described methods. Specifically, genotypes at codons 49 [14] and 389 [15] of the β1ADR; genotypes at codons 16 [16], 27 [17] and 164 [16] of the β2ADR; genotype at codon 347 [18] of the α1aADR; genotype of the insertion/deletion (322-325) polymorphism [19] for the α-2C adrenergic receptor (α2cADR) and genotype of the CYP2D6 polymorphism (variants *1,*3,*4,*5

(deletion),*6,*7,*8 and gene multiplication variants) [20, 21] were determined in this study (Table 1). The obtained PCR products were allowed to separate through electrophoresis on agarose gels (0.8-4%) and identified by ethidium bromide staining under an UV light. Genotypes were scored by 2 blinded investigators who were unaware of the subjects' clinical drug responses. In cases of genotype uncertainty, the sample underwent a second PCR-RFLP analysis. Patients were considered to have been officially scored when the genotype was unambiguous. All the required primers and PCR products were obtained from Invitrogen (Carlsbad,CA,USA), with the exception of the Expand Taq polymerase, which was obtained from Roche (Indianapolis, IN, USA). All the essential products for the RFLP reaction were obtained from New England BioLabs (Pickering, ON, Canada).

2.5 Data Collection

Pertinent data defined as: demographic information (e.g. age, sex, weight, etc.), concomitant drug treatments and their corresponding dosage and schedule, concomitant health problems, NYHA FC and time of HF diagnosis were obtained from medical charts, as well as from questioning. All blood works and laboratory data, with the exception of the carvedilol enantiomer quantification and genotyping, were performed at the Montreal Heart Institute or the Quebec Heart Institute, within the framework of a routine HF patient follow-up.

2.6 Data Analysis

Baseline population characteristics were presented using descriptive statistics, such as mean \pm standard deviation (SD) or percentage (%), as appropriate. Baseline characteristics were compared between genotypes by the use of the chi-square test or the Student unpaired *t*-test, as appropriate. The genotypes were tested for deviation from Hardy-Weinberg proportions to detect any systematic genotyping errors or sample admixture by calculating the expected genotype frequencies from the allele frequencies and determining the deviation from the observed genotype frequencies using the chi-square test, when suitable. The pre-dose hemodynamic data, the post-dose hemodynamic data, the pre-dose S- and R-carvedilol concentration and the post-dose S- and R-carvedilol concentrations were compared between genotypes by the Student unpaired *t* test and the Mann-Whitney U test if necessary. Treatment effect (pre- versus *post*-dose hemodynamic variation) and the drug concentration variations (pre- versus post-dose S- and R-carvedilol concentrations) were compared by the Student paired *t* test when performing analysis on the entire population or within a specific genotype, and by the Student unpaired *t* test when comparing between genotypes. Covariate testing for confounding factors was performed using a univariate generalized linear model, if necessary. Sample size calculation was based on the paired difference model considering the treatment effect of carvedilol on the pre- versus post-HR variation as the primary endpoint. For an aspired variation of 5 bpm, with a presumed standard deviation of 10 bpm in both the pre- and post-HR, an alpha error of 0.05 and a beta error of 0.2, a sample size

of 37 patients was required in at least one of the allele-carrying group for each given evaluated genotype.

Patients carrying two null alleles at their CYP2D6 gene were classified as poor metabolisers (PMs). Conversely, patients having at least one *1 allele, were classified as extensive metabolisers (EMs). However, since all patients continued their regular medication regime, anyone who had a documented intake of a potent CYP2D6 inhibitor or a higher affinity CYP2D6 substrate than carvedilol, as classified by the InterMED-Rx P-450 table [22], was immediately classified as a PM, regardless of his genotype.

All statistical analyses were performed with the use of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) statistics software (version 17.0, 23rd of august 2008 release, Chicago, Illinois, USA), and all tests were two-sided with significance threshold set to 0.05.

3. Results

A total of 59 patients were enrolled in this study. Baseline characteristics for the patient population are shown in Table 2. A great majority of participants in this study were men (86%) and the mean age of this group was 61 years old. As expected, this group carried many cardiovascular risk factors, such as diabetes (34%), hypertension (47%), dyslipidemia (68%) or a positive history of smoking (63%). The mean duration of their HF was a little over 5 years and a vast majority (76%) were in class II of the NYHA FC at the time of recruitment. With regards to genotyping, all of the patients were genotyped successfully for all of the studied polymorphisms. Moreover, all of the studied genotype distributions were compatible with Hardy–Weinberg expectations. Genotyping results are presented in Table 2.

We observed a rather large mean decrease in the HR (3.7 bpm , $p < 1 \times 10^{-9}$) and in the SBP (5.1 mmHg , $p < 0.0001$) in this patient population after carvedilol administration. On the other hand, the DBP did not vary significantly ($p = \text{NS}$), whereas the mean arterial pressure (MAP) decreased only by 1.6 mmHg ($p = 0.06$). However, we noticed a major difference in the HR reduction within the $\beta 1\text{ADR}$ genotype, where the Ser49 homozygotes ($n = 47$) had a mean decrease of 4.5 bpm and the Gly49 carriers ($n = 12$) of only 0.6 bpm (mean difference of 3.9 bpm , $p = 0.001$) (Figure 2). Interestingly, those results ensued despite these groups receiving matching carvedilol doses (10.7 ± 7.7 vs $12.4 \pm 8.6 \text{ mg}$, $p = 0.54$), having comparable post-dose carvedilol plasma concentrations (57.7 ± 63.8 vs $81.7 \pm 101.4 \text{ ng/ml}$, $p = 0.44$) and almost identical baseline HRs ($67.0 \pm$

9.0 vs 67.6 ± 11.1 bpm, $p=0.88$). With regards to the other $\beta 1$ ADR polymorphism evaluated, the Arg389Gly genotype was not associated with a disparate HR reduction. Moreover, combining these two genotypes into haplotypes did not translate into any additional disparate HR lowering effect beyond that which was observed by solely considering the Gly49Ser polymorphism.

As a secondary outcome, concerning the BP, carriers of a (322-325) deletion in the $\alpha 2c$ ADR ($n=9$) had a mean increase of 2.4 and 4.5 mmHg, as opposed to the non-carriers ($n=50$), who had a mean decrease of 6.5 and 0.8 mmHg in their SBP and DBP, respectively, after carvedilol administration. This resulted in a mean difference of 9 mmHg in the SBP ($p=0.01$) (Figure 3a) and of 5.3 mmHg in the DBP ($p=0.008$) (Figure 3b) between these two genotypes. The MAP was also significantly different between these two genotypes, with a mean difference of 6.5 mmHg (increase of 2.6 mmHg for the carriers of the deletion vs decrease of 3.9 mmHg for the non-carriers, $p=0.005$) (Figure 3c). As was the case previously, those results also occurred despite these groups receiving matching carvedilol doses (12.4 ± 8.4 vs 10.1 ± 8.7 mg, $p=0.46$), having comparable post-dose carvedilol plasma concentrations (78.2 ± 98.8 vs 69.2 ± 74.4 ng/ml, $p=0.80$) and similar baseline SBPs (108.9 ± 19.4 vs 101.6 ± 8.0 mmHg, $p=0.30$) and DBPs (64.9 ± 9.4 vs 61.7 ± 5.8 mmHg, $p=0.32$).

Testing for demographic differences (sex, age, duration of HF, NT-proBNP, HF etiology, LVEF, diabetes, hypertension, history of tobacco use, BMI, creatinine clearance, digoxin use and spironolactone use) based upon genotype at the two positions

with positive findings (α 2c-ADR del(322-325) & B1ADR Ser49Gly), did not reveal any statistically significant findings, with the exception of a larger proportion of females carrying the del(322-325) allele (0.5 vs 0.1, $p=0.01$).

Carvedilol pharmacokinetics was not associated with CYP2D6 phenotype in this study. Indeed, controlling for the administered carvedilol dose and after categorization of patients as either PMs or EMs, neither the pre-dose, the post-dose nor the increase from pre- to post-dose for neither the *S*- nor the *R*-carvedilol plasma concentrations were associated with the CYP2D6 phenotype. (Figure 4).

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first to examine the impact of certain α - and β -adrenergic receptor polymorphisms on the inter-individual variability of the hemodynamic response to carvedilol in stable HF patients. Additionally, this study is also the first to perform such an assessment in a population that was not newly diagnosed with HF and was not naïve to a β -blocker treatment. Indeed, one can categorize carvedilol-treated HF patients into three groups: those that begin the treatment and are up-titrated to a maximally tolerated dose, those that are maintained on a certain dose and those that decompensate and need a temporary reconsideration of their β -blocker therapy. Since the majority of patients with HF spend the majority of time being maintained on a certain stable β -blocker dose, by extension, we presume that the results herein presented pertain to the majority of patients currently affected by HF that are treated with carvedilol.

The main findings of the present study are as follows: a nonsynonymous polymorphism in the gene for the β 1ADR – a Ser to Gly substitution at codon 49 – and a nonsynonymous polymorphism in the gene for the α 2cADR – a deletion of four consecutive amino acids (322-325) - both appear to affect the hemodynamic response to carvedilol in stable HF patients. Whereas the former modulates HR response, the latter influences blood pressure reaction after carvedilol administration.

To date, only a few clinical studies have evaluated if the β 1ADR gene variants modify the response to β -blocker therapy in heart failure. Most of those studies found the

Arg to Gly variant at codon 389 to be associated with inter-individual variability towards β -blockade. The most famous example would have to be the retrospective analysis of the BEST study. In that trial, no survival difference between the treatment and the placebo groups was found. However, in the 1040 patients that consented to the genetics sub-study, Arg389 homozygotes treated with bucindolol had a significant reduction in mortality compared to Arg389 homozygotes on placebo whereas there was no difference in outcome between the Gly389 carriers on bucindolol and those on placebo [23]. Unfortunately, neither the Ser49Gly, nor the (322-325) deletion, polymorphisms were evaluated in that analysis. On the other hand, the Arg389Gly genotype did not confer any survival benefit in a substudy of MERIT-HF [24], a study comprising 600 patients, some of whom were treated with metoprolol for a mean of 12 months.

In a study of 224 HF patients treated with carvedilol, Perez et al. [25] found that Arg389 homozygotes had a greater improvement in the LVEF than Gly389 homozygotes and that the heterozygotes showed an improvement similar to that of Arg389-homozygous patients. The Ser49Gly polymorphism was yet again not evaluated in this study. Similar results were obtained by Chen et al. [26] in 135 patients affected by dilated cardiomyopathy and treated with carvedilol for 1.5 years, although the patients who were heterozygous for Arg389Gly showed an improvement similar to that of Gly389 homozygotes. Moreover, Terra et al. [27] obtained comparable results in 61 patients on metoprolol CR/XL. However, these results were not confirmed by de Groote et al. [28] who investigated 199 patients with stable HF treated with the maximal tolerated dose of either carvedilol or bisoprolol. No significant association was observed between the

LVEF improvement and β 1ADR polymorphisms (Ser49Gly and Arg389Gly) in that study.

Only three clinical studies reported an association between response to β -blocker therapy and the Ser49Gly variant in HF. Borjesson et al. [29] demonstrated in a 5 year follow-up of 184 patients that Ser49 homozygotes had a higher risk of death or transplantation than Gly49 carriers. However, not even 40% of those patients were actually treated with a β -blocker and the type and dose of β -blocker used were not revealed. Conversely, Magnusson et al. [30] obtained completely opposite results in 139 patients, where the Gly49 carriers had a significantly higher risk of death or cardiac transplantation within 5 years than patients homozygous for the Ser49 variant. However, these outcomes were only noted in patients treated with a low dose of β -blocker, since in patients taking a high dose, the genotype-dependent differences were not observed. And lastly, Terra et al. [27] illustrated in a study of 61 metoprolol CR/XL-treated patients with systolic HF that Gly49 carriers had a significantly greater reduction in left ventricular end-diastolic diameter than did the Ser49 homozygotes after as early as 5 months of treatment.

With regards to the α 2cADR (322-325) deletion polymorphism, the data on β -blocker response in HF is also scarce. However, both Lobmeyer et al. [31] and Regitz-Zagrosek et al. [32] point towards the notion that patients carrying the deletion allele derive greater clinical benefit from a β -blocker therapy than do the non-carriers. This seems to stem from the loss of normal synaptic autoinhibitory feedback that the α 2cADR

provides. The deletion in the gene creates a dysfunctional receptor that results in enhanced presynaptic release of norepinephrine [33], which is associated with increased all-cause and cardiovascular mortality, development of HF and hospitalisation for HF [34]. Those higher risk patients then seem to derive greater benefit from a β -blocker, which through its pharmacological action, halts this deleterious pathway.

Out of all of the above-mentioned studies, only the one by Terra et al. [27] reported the hemodynamic effects of their studied β -blocker with regards to β 1ADR polymorphisms. No difference was noted between the codon 389 genotypes with respect to the final HR, as well as with the percentage of HR reduction from baseline. Similarly, the authors found no difference in the codon 49 polymorphism and the final HR. Blood pressure variation was however not reported. The major caveat in those results is the lack of disclosure on how and when in relation to the β -blocker was the HR measured. Given the minute-to-minute variability in HR, failure to collect HR data in a very controlled and precise fashion, may lead to a variability that is too great to discern any impact of genetics on the HR response to β -blockers. That principle also applies to the BP data collection. Our study is therefore the first to provide a glimpse into the disparate hemodynamic outcome of carvedilol therapy with respect to various α - and β -adrenergic receptor polymorphisms, and this through a controlled and precise measurement of the hemodynamic component of a β -blockade. In addition, most of studies do not account for β -blocker pharmacokinetics, which is an important source of confounding. Even in a thoroughly followed protocol, where patients are mandated to intake the same dose of the studied drug, differences in the unique biometrical state of each participating individual

make the inclusion of pharmacokinetic data absolutely critical. Although the measurement of blood concentrations is still not perfect in that regard, as opposed to the measurement of target tissue drug concentrations would, it is currently the best tool in limiting the source of confounding variables related to drug administration. With that being said, the disparities in hemodynamic responses to carvedilol between genotypes found in our study are not pharmacokinetically driven. Specifically, those disparities were not accompanied by a concurrent difference in plasma carvedilol concentrations. Conversely, we can presume that the above-mentioned disparities in hemodynamic response to carvedilol are based on genotype alone.

Our findings may seem unforeseen and even provocative, especially with regards to the BP raising in patients carrying the del(322-325) variant. This unexpected result may however be explained through carvedilol's rather peculiar effect on norepinephrine release in the synapse. Through a yet unknown mechanism, carvedilol, in contrast to other classic β_1 -selective and -nonselective β -blockers, exerts a biphasic response on presynaptic norepinephrine release. Specifically, an initial facilitation of norepinephrine release precedes the subsequent suppression seen with other β -blockers [35]. Since the del(322-325) variant severs the presynaptic autoinhibitory feedback of the α_2 cADR, it is quite possible that the initial facilitated norepinephrine release is augmented to the point of transiently affecting the patient's BP. It remains to be established whether this transient spike in BP is of clinical relevance in del(322-325) carriers.

On the other hand, the unequal HR lowering observed between the β 1ADR Ser49Gly genotypes may be explained by a disparate receptor behaviour based on its genotype status. According to *in vitro* data, the Gly49 variant demonstrates a higher basal and agonist-stimulated activity [36]. Antagonising this more active receptor variant should therefore logically translate into a more profound β -blocking response. However, the Gly49 variant also shows much higher desensitization and displays a more profound agonist-promoted down-regulation. Under these conditions, which mimic heart failure, the Ser49 allele then becomes the more active variant, which when blocked, translates into a more intense response.

On a further notice, the lack of pharmacokinetic data correlation with the CYP2D6 phenotype can be explained by a multitude of factors. First, this study was not designed to test for this outcome and might therefore lack power in detecting such a correlation. Second, carvedilol is not solely metabolised by CYP2D6, but rather also by CYPs 1A2, 2C9, 3A4 and 2E1 and by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 2B4 and 2B7[37, 38]. In addition, the transporter proteins P-glycoprotein (MDR1) and the multidrug resistance protein 2 (MRP2) are also involved in the disposition of this drug [39]. As such, proper control for all those confounding variables would have been necessary in order for the CYP2D6 enzyme to rise above this background variability. However, such a control does not exist in a multidrug treated HF population, since any one additional medication that such a patient uses, usually affects at least one, if not many, of these alternative metabolism pathways of carvedilol and ultimately belies the true CYP2D6 phenotype status. And lastly, due to the limitative number of patients, the

CYP2D6 phenotype status was depicted as a discreet binomial categorization. This was an intended, however crude, oversimplification, since CYP2D6 phenotyping through genotype should be rather viewed as a multinomial distribution with probably at least four predominant peaks as the number of allele combinations keeps increasing with the growing number of newly discovered variant alleles [40]. Regardless, the CYP2D6 phenotyping had no incident on the assessment of the hemodynamic data with regards to the α - or β -adrenergic receptor polymorphisms.

We are aware of certain perceived limitations in our study. Notably, the relatively limited number of participants could be viewed as a constraint. However, in order to minimize the externally introduced potential for variability and to maximize that the hemodynamic results are genotype-driven, we had to maintain our population as homogenous as possible. Consequently, the participants were carefully chosen, especially with regards to them being clinically stable and maintaining a constant β -blocker dose for a lengthy period of time. This approach obviously hurts the recruiting process. However, given the choice of undertaking a study with either a large sample but with mitigated homogeneity and a smaller sample but with firm participation criteria, we decided on reporting genotype-focused, and not number-driven, effects. Nonetheless, we were able to detect statistically significant associations between genotype and the quantified hemodynamic parameters. Inadequate power could be recognized as a greater issue with regards to the other studied polymorphisms. As such, the lack of significant associations with certain of the study parameters and the other genotypes and haplotypes cannot be taken as evidence that such an association does not exist. In fact, the significant effect of codon 49 on HR

and the (322-325) deletion variant on BP suggest that a larger study, adequately powered for haplotype analyses, is needed to further clarify the influence of these polymorphisms with relation to the adrenergic pathway on the hemodynamic response of carvedilol in stable HF. Another aspect, which could be viewed as a limitation by some, is that we performed this study in individuals that were already on other concomitant medications. On the other hand, for ethical reasons, performing that kind of study would have been impossible otherwise. What's more, the current scenario permitted us to test our hypothesis in a real life situation, where patients with HF do take a multitude of various drugs and there is no way around it. By extension, due to ethical premises and by concern for the patient's safety and well-being, a longer than the performed 24 hours washout period would have been unwise, because this could lead to hypersensitivity of β -adrenergic receptors and worsening of HF. Based on findings reported by Kindermann et al. [41], by the 44th hour mark after drug withdrawal, carvedilol still maintains a somewhat diminished β -blocking, and therefore protective, effect. However, those findings stem from a small number of healthy volunteers where β -adrenergic receptor hypersensitivity is not an issue. Furthermore, those results have not been confirmed in a HF-afflicted population. Hence, in our judgment, a longer than 24 hours long washout period could be potentially hazardous and was therefore avoided in this study. The potential incomplete washout may be perceived as a limitation in our study. However, in the occurrence that carvedilol does produce a prolonged efficacy at its binding site, in the setting of an incomplete washout, our results are at worst very conservative, yet still significant, and may prelude an even larger hemodynamic effect if the washout had been complete.

5. Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that the codon 49 of the β 1ADR and the α 2cADR's (322-325) deletion/insertion polymorphisms are associated with a discrepant hemodynamic response of carvedilol in stable HF individuals. If confirmed in a larger study that incorporates haplotype data with clinical outcomes, targeted HF therapy based on pharmacogenomics might be done at some point in the future. The current trial-and-error approach to pharmacotherapy is on a way to extinction. In contrast to this approach, pharmacogenomic-based therapy will focus on the individual and will provide the necessary pillar for an increased safety and efficacy of drug treatment.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the MHI research nurse CA and the head nurse LW. Financial Support was provided by the Canadian Institute for Health Research and by the Heart & Stroke Foundation of Canada.

Conflict of Interest/Disclosure

MZ has no conflict of interest to declare. SdD has no conflict of interest to declare. M-HL has no conflict of interest to declare. MW has no conflict of interest to declare. JT has no conflict of interest to declare

Table Legends

Table 1: Genotyping conditions

Table 2: Heart failure population baseline characteristics

Table 1: Genotyping conditions

Gene	Polymorphism	Primer sequence	PCR conditions ¹	RFLP enzyme
β1ADR	Gly49Ser	<i>f</i> : 5' CCG GGC TTC TGG GGT GTT CC 3' <i>r</i> : 5' GGC GAG GTG ATG GCG AGG TAG C 3'	94x3m 40 cycles: (94x30s, 65x30s, 72x30s) 72x7m	EcoO109 I
β1ADR	Gly389Arg	<i>f</i> : 5' GGA GCC GCC TCT TCG TCT TCT TCA ACT G 3' <i>r</i> : 5' TGG GCT TCG AGT TCA CCT GCT ATC 3'	98x5m 35 cycles: (98x45s, 60x60s, 72x60s) 72x7m	BsmF1
β2ADR	Arg16Gly	<i>f</i> : 5' GAA CGG CAG CGC CTT CTT GCT GGC ACC CCA T 3' <i>r</i> : 5' CTG CCA GGC CCA TGA CCA GAT CAG 3'	94x2m 35 cycles: (94x30s, 64x45s, 72x60s)	StyI

			72x7m	
β2ADR	Gln27Glu	<i>f</i> : ^{5'} GCC TTC TTG CTG GCA CCC AAT ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} GGA AGT CCA AAA CTC GCA CCA ^{3'}	94x2m 40 cycles: (94x60s, 54x60s, 72x2m)	BdvI
			72x10m	
β2ADR	Thr164Ile	<i>f</i> : ^{5'} GTG ATC GCA GTG GAT CGC TAC T ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} AGA CGA AGA CCA TGA TCA CCA G ^{3'}	94x2m 35 cycles: (94x30s, 58x45s, 72x60s)	MnII
			72x7m	
α1aADR	Arg347Cys	<i>f</i> : ^{5'} ATG CTC CAG CCA AGA GTT CA ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} TCC AAG AAG AGC TGG CCT TC ^{3'}	94x4m 35 cycles: (94x45s, 55x45s, 72x60s)	StyI
			72x7m	
α2cADR	ins/del (322-325)	<i>f</i> : ^{5'} AGC CCG ACG AGA GCA GCG CA ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} AGG CCT CGC GGC AGA TGC CGT ACA ^{3'}	94x4m 35 cycles:	NciI

			(94x30s, 64x30s, 72x60s)	
			72x7m	
CYP2D6	pre-fragment	<i>f</i> : ^{5'} GGT AAG GGC CTG GAG CAG GAA ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} GCC TCA ACG TAC CCC TGT CTC ^{3'}	94x2m 30 cycles: (94x30s, 65x30s, 72x45s) 72x7m	n/a
CYP2D6	*5 (deletion)	<i>f</i> : ^{5'} ACC GGG CAC CTG TAC TGG TCA ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C ^{3'}	94x2m 35 cycles: (94x60s, 65x30s, 68x5m) 72x10m	n/a
CYP2D6	duplication/ multiplication	<i>f</i> : ^{5'} CCT GGG AAG GCC CCA TGG AAG ^{3'} <i>r</i> : ^{5'} CAG TTA CGG CAG TGG TCA GCT ^{3'}	94x2m 35 cycles: (94x12s, 68x7m) 72x7m	n/a
CYP2D6	common	<i>f</i> : ^{5'} GTG GGG CTA ATG CCT T ^{3'}	94x2m	n/a

forward

14 cycles:

(94x2m, 55x30s, 72x3.3m)

72x7m

2637A	<i>r</i> :: ^{5'} GGG TCC CAG GTC ATC CT ^{3'}
2637C (*3)	<i>r</i> :: ^{5'} GGG TCC CAG GTC ATC CG ^{3'}
1934G	<i>r</i> :: ^{5'} CGA AAG GGG CGT CC ^{3'}
1934A (*4)	<i>r</i> :: ^{5'} CGA AAG GGG CGT CT ^{3'}
1975T	<i>r</i> :: ^{5'} CTC CTC GGT CAC CCA ^{3'}
1975G (*6)	<i>r</i> :: ^{5'} CTC CTC GGT CAC CCC ^{3'}
3023A	<i>r</i> :: ^{5'} GCT GCA CAT CCG GAT ^{3'}
3023C (*7)	<i>r</i> :: ^{5'} GCT GCA CAT CCG GAG ^{3'}
1846G	<i>r</i> :: ^{5'} TCT GCC CAT CAC CCA CC ^{3'}
1846T (*8)	<i>r</i> :: ^{5'} TCT GCC CAT CAC CCA CA ^{3'}

[†] temperature in Celsius (°C); m, minutes; s, seconds

α 1aADR, α 1A-adrenergic receptor; α 2cADR, α 2C-adrenergic receptor; β 1ADR, β 1-adrenergic receptor; CYP2D6, cytochrome 2D6; *f*, forward primer; PCR, polymerase chain reaction; *r*, reverse primer; RFLP, restricted fragment length polymorphism

Table 2: Heart failure population baseline characteristics

Variable	
n=59	
Men, %	86
Caucasian, %	100
Age, years	61 ± 11
Duration of HF, years	5.3 ± 4.6
NT-proBNP (ng/L)	1414.5 ± 1941.7
Ischemic cause for HF, %	56
LVEF, %	26 ± 6.6
NYHA FC I/II/III, %	14 / 76 / 10
Diabetes, %	34
Hypertension, %	47
Dyslipidemia, %	68
Hx. Tobacco, %	63
Body mass index, kg/m ²	27.5 ± 5
Creatinine clearance, ml/min	67.9 ± 27.9
Background Pharmacologic Treatment	
ACE inhibitor, %	78
ARB, %	22
Furosemide, %	68

Hypolipemic, %	78
Spirinolactone, %	47
Digoxin, %	49

Genotyping Results¹

β1ADR Gly49Ser	0 12 47	(0 20 80)
β1ADR Gly389Arg	4 20 35	(7 34 59)
β2ADR Arg16Gly	6 29 24	(10 49 41)
β2ADR Gln27Glu	17 30 12	(29 51 20)
β2ADR Thr164Ile	58 1 0	(98 2 0)
α1aADR Arg347Cys	11 30 18	(19 51 30)
α2cADR ins/del(322-325) carrier	50 9	(85 15)
CYP2D6 EM/PM	44 15	(75 25)

¹ Genotypes are presented in number and in (%) as follows: wt/wt|wt/var|var/var where wt:wild type, var:variant.

α1aADR, α1A-adrenergic receptor; α2cADR, α2C-adrenergic receptor; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; β1ADR, β1-adrenergic receptor; β2ADR, β2-adrenergic receptor; CYP2D6, cytochrome 2D6; EM, extensive metabolisers; HF, heart failure; Hx, positive history; LVEF, left ventricular ejection fraction; NYHA FC, New York Heart Association Functional Class; PM, poor metabolisers.

Data are given as mean ± SD, or % as appropriate

Figure Legends

Figure 1: Scheme of derivatization of carvedilol with 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)

Figure 2: Influence of the β_1 -adrenergic receptor (β_1 ADR) Ser49Gly polymorphism on heart rate variation after carvedilol administration.

Figure 3: Influence of the α_{2C} -adrenergic receptor (α_{2C} ADR) (322-325) deletion polymorphism on systolic blood pressure (A), diastolic blood pressure (B) and mean arterial pressure (C) variation after carvedilol administration.

Figure 4: Concentration/dose ratio values for the S- and R-carvedilol with regards to the CYP2D6 phenotype as measured for the pre-dose (A), the post-dose (B) and the increase from pre- to post-dose (C) following carvedilol administration.

Figure 1: Scheme of derivatization of carvedilol with 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)

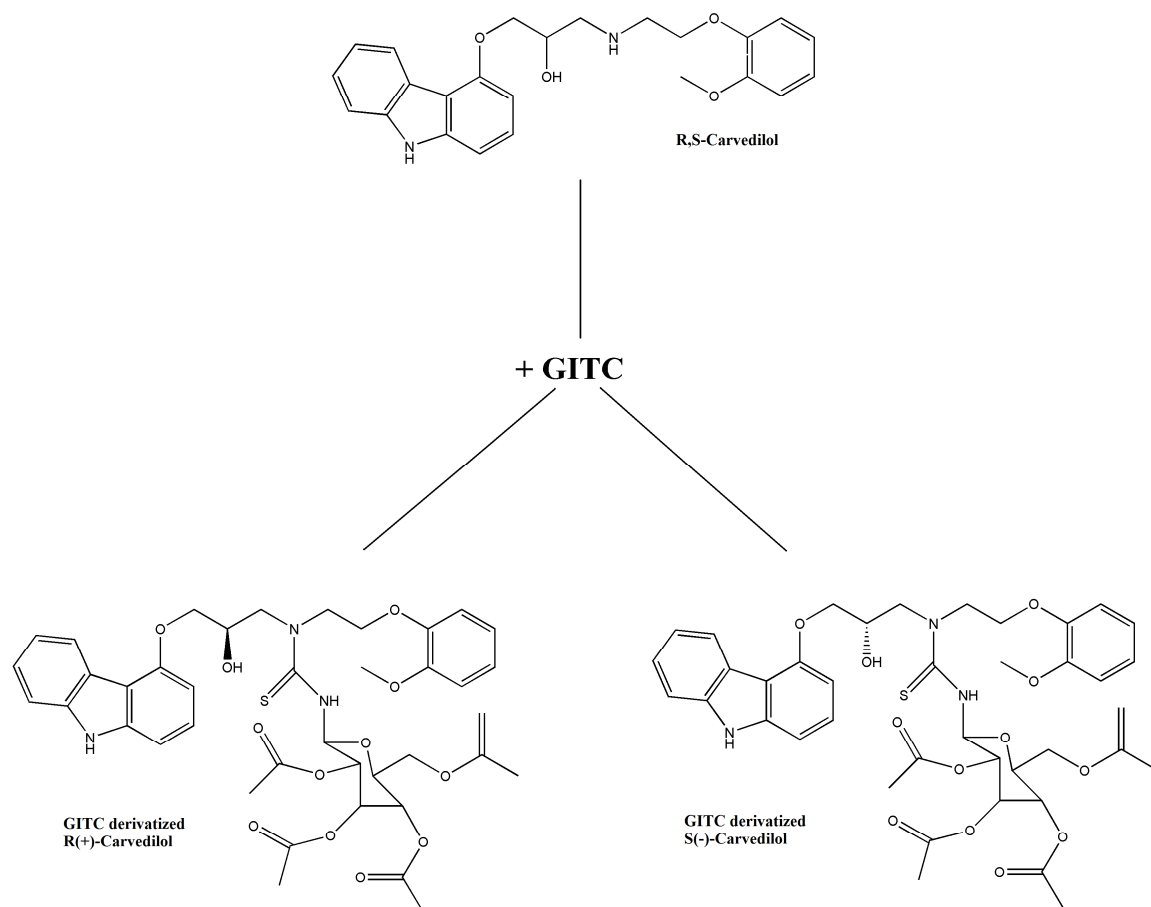
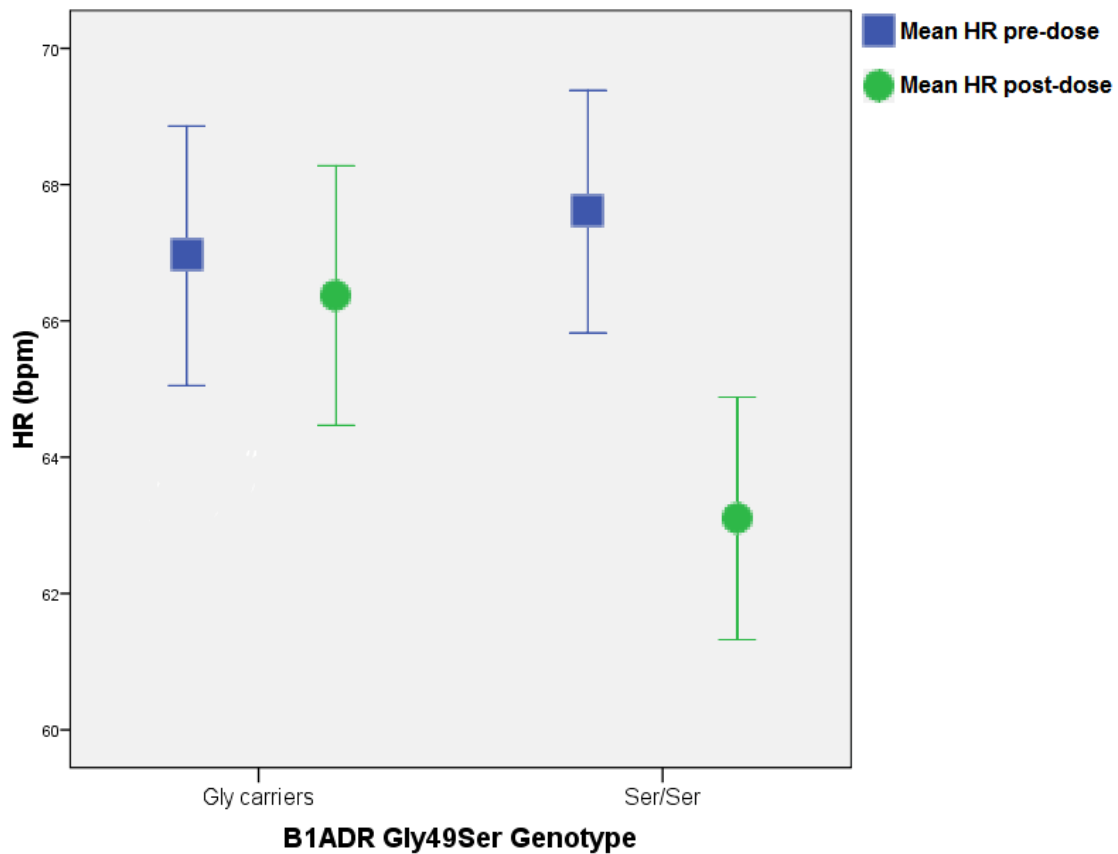


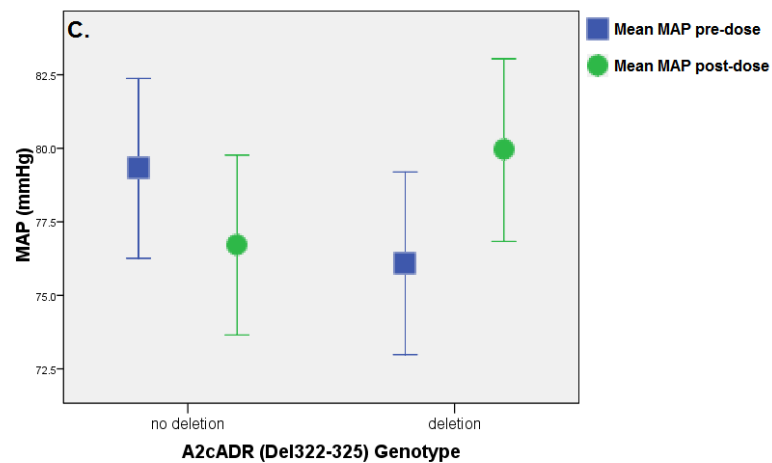
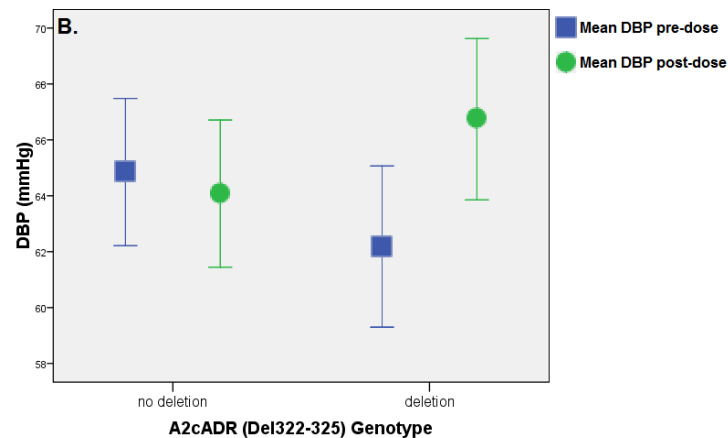
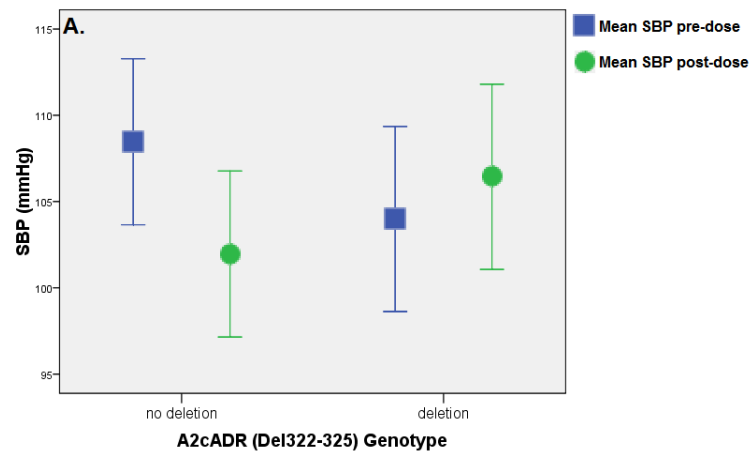
Figure 2: Influence of the β_1 -adrenergic receptor (β_1 ADR) Ser49Gly polymorphism on heart rate variation after carvedilol administration.



β_1 ADR, β_1 -adrenergic receptor; bpm, beats per minute; HR, heart rate.

Data points represent mean \pm SD

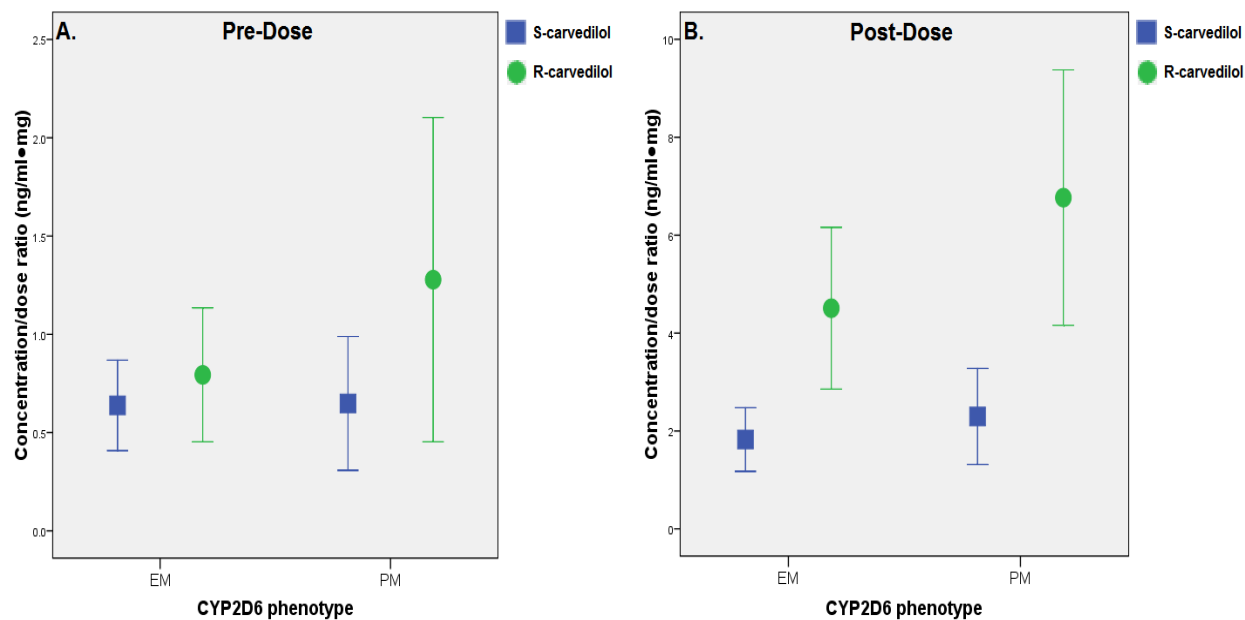
Figure 3: Influence of the α_2C -adrenergic receptor (α_2cADR) (322-325) deletion polymorphism on systolic blood pressure (A), diastolic blood pressure (B) and mean arterial pressure (C) variation after carvedilol administration.



α_2cADR , α -2C adrenergic receptor; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; mmHg, millimetres of mercury; SBP, systolic blood pressure.

Data points represent mean \pm SD

Figure 4: Concentration/dose ratio values for the S- and R-carvedilol with regards to the CYP2D6 phenotype as measured for the pre-dose (A), the post-dose (B) and the increase from pre- to post-dose (C) following carvedilol administration.



CYP2D6, cytochrome 2D6; EM, extensive metabolisers ; PM, poor metabolisers.

Data points represent mean \pm CI95%

References

- [1] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009 Jan 27;119(3):e21-181.
- [2] Johansen H, Strauss B, Arnold JM, Moe G, Liu P. On the rise: The current and projected future burden of congestive heart failure hospitalization in Canada. *Can J Cardiol* 2003 Mar 31;19(4):430-5.
- [3] Association AH. Heart Disease and Stroke Statistics--2005 Update. American Heart Association 2005.
- [4] Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009 Apr 14;119(14):e391-479.
- [5] Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999 Jun 12;353(9169):2001-7.
- [6] Krum H, Roecker EB, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Coats AJ, et al. Effects of initiating carvedilol in patients with severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS Study. *JAMA* 2003 Feb 12;289(6):712-8.

- [7] Leizorovicz A, Lechat P, Cucherat M, Bugnard F. Bisoprolol for the treatment of chronic heart failure: a meta-analysis on individual data of two placebo-controlled studies--CIBIS and CIBIS II. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *Am Heart J* 2002 Feb;143(2):301-7.
- [8] Zugck C, Haunstetter A, Kruger C, Kell R, Schellberg D, Kubler W, et al. Impact of beta-blocker treatment on the prognostic value of currently used risk predictors in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002 May 15;39(10):1615-22.
- [9] Feldman AM. The emerging role of pharmacogenomics in the treatment of patients with heart failure. *Ann Thorac Surg* 2003 Dec;76(6):S2246-53.
- [10] Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher D, et al. Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *Eur Heart J* 1996 Apr;17 Suppl B:8-16.
- [11] Gu D, Ge D, Snieder H, He J, Chen S, Huang J, et al. Association of alpha1A adrenergic receptor gene variants on chromosome 8p21 with human stage 2 hypertension. *J Hypertens* 2006 Jun;24(6):1049-56.
- [12] Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004 Jan;369(1):23-37.
- [13] Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Leblanc MH, White M, Turgeon J. Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients. *J Pharm Biomed Anal* Aug 1;52(4):636-41.
- [14] Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389 beta 1-adrenoceptors

- versus Gly389 beta 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol* 2003 Jan;138(2):386-92.
- [15] Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999 Apr 30;274(18):12670-4.
- [16] Aynacioglu AS, Cascorbi I, Gungor K, Ozkur M, Bekir N, Roots I, et al. Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor among Turks. *Br J Clin Pharmacol* 1999 Nov;48(5):761-4.
- [17] Kaye DM, Smirk B, Williams C, Jennings G, Esler M, Holst D. Beta-adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. *Pharmacogenetics* 2003 Jul;13(7):379-82.
- [18] Mochtar CA, Laan W, Van Houwelingen KP, Franke B, De La Rosette JJ, Schalken JA, et al. Polymorphisms in the alpha1A-adrenoceptor gene do not modify the short- and long-term efficacy of alpha1-adrenoceptor antagonists in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2006 Apr;97(4):852-5.
- [19] Tsai SJ, Wang YC, Hong CJ. Norepinephrine transporter and alpha(2c) adrenoceptor allelic variants and personality factors. *Am J Med Genet* 2002 Aug 8;114(6):649-51.
- [20] Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR, et al. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995 Aug;5(4):215-23.

- [21] Stuvén T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996 Oct;6(5):417-21.
- [22] P-450 Table. 2010 [cited 2010 2nd march 2010]; Available from: <http://www.intermed-rx.ca>
- [23] Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, et al. A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jul 25;103(30):11288-93.
- [24] White HL, de Boer RA, Maqbool A, Greenwood D, van Veldhuisen DJ, Cuthbert R, et al. An evaluation of the beta-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals with heart failure: a MERIT-HF sub-study. *Eur J Heart Fail* 2003 Aug;5(4):463-8.
- [25] Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003 Oct;9(10):1300-5.
- [26] Chen L, Meyers D, Javorsky G, Burstow D, Lolekha P, Lucas M, et al. Arg389Gly-beta1-adrenergic receptors determine improvement in left ventricular systolic function in nonischemic cardiomyopathy patients with heart failure after chronic treatment with carvedilol. *Pharmacogenet Genomics* 2007 Nov;17(11):941-9.
- [27] Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson JH, Adams KF, et al. Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling

- changes in response to beta-blocker therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2005 Apr;15(4):227-34.
- [28] de Groote P, Helbecque N, Lamblin N, Hermant X, Mc Fadden E, Foucher-Hossein C, et al. Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2005 Mar;15(3):137-42.
- [29] Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, Andersson B. A novel polymorphism in the gene coding for the beta(1)-adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000 Nov;21(22):1853-8.
- [30] Magnusson Y, Levin MC, Eggertsen R, Nystrom E, Mobini R, Schaufelberger M, et al. Ser49Gly of beta1-adrenergic receptor is associated with effective beta-blocker dose in dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2005 Sep;78(3):221-31.
- [31] Lobmeyer MT, Gong Y, Terra SG, Beitelshes AL, Langae TY, Pauly DF, et al. Synergistic polymorphisms of beta1 and alpha2C-adrenergic receptors and the influence on left ventricular ejection fraction response to beta-blocker therapy in heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2007 Apr;17(4):277-82.
- [32] Regitz-Zagrosek V, Hoher B, Bettmann M, Brede M, Hadamek K, Gerstner C, et al. Alpha2C-adrenoceptor polymorphism is associated with improved event-free survival in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006 Feb;27(4):454-9.

- [33] Minatoguchi S, Ito H, Ishimura K, Watanabe H, Imai Y, Koshiji M, et al. Modulation of noradrenaline release through presynaptic alpha 2-adrenoceptors in congestive heart failure. *Am Heart J* 1995 Sep;130(3 Pt 1):516-21.
- [34] Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, Francis G, Greenberg B, Konstam M, et al. Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Circulation* 1996 Aug 15;94(4):690-7.
- [35] Kurz T, Richardt D, Gorge B, Hartmann F, Tolg R, Katus HA, et al. Differential effects of carvedilol on norepinephrine release in normoxic and ischemic heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Jul;36(1):96-100.
- [36] Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002 Aug 23;277(34):30429-35.
- [37] Oldham HG, Clarke SE. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. *Drug Metab Dispos* 1997 Aug;25(8):970-7.
- [38] Ohno A, Saito Y, Hanioka N, Jinno H, Saeki M, Ando M, et al. Involvement of human hepatic UGT1A1, UGT2B4, and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol. *Drug Metab Dispos* 2004 Feb;32(2):235-9.
- [39] Giessmann T, Modess C, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Kunert-Keil C, et al. CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin

predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther 2004 Mar;75(3):213-22.

- [40] Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. Clin Pharmacokinet 2009;48(11):689-723.
- [41] Kindermann M, Maack C, Schaller S, Finkler N, Schmidt KI, Laer S, et al. Carvedilol but not metoprolol reduces beta-adrenergic responsiveness after complete elimination from plasma in vivo. Circulation 2004 Jun 29;109(25):3182-90.

Épilogue

L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'influence de certaines variantes génétiques sur la réponse pharmacodynamique du carvédilol. Vu le mécanisme d'action de ce médicament, cette réponse fut basé nécessairement sur des effets hémodynamiques. Puisque la réponse pharmacodynamique puisse être affectée par la cinétique d'une molécule active, et que par principe moral et éthique nous ne pouvions modifier la posologie de celle-ci, il était incontournable de mesurer les concentrations plasmatiques de carvédilol lors des mesures hémodynamiques et d'exclure les différences cinétiques comme coupables de toute différence significative notée. Vu la disponibilité des concentrations plasmatiques désormais accessibles, le deuxième objectif avait pour but d'évaluer l'influence de certaines variantes génétiques du cytochrome 2D6, l'enzyme majoritairement responsable du métabolisme du carvédilol, sur certains paramètres pharmacocinétiques de celui-ci.

Un autre point que nous voulions accentuer par la réalisation de cette étude fait un peu référence à l'objectif #1 énoncé dans la section 2.0 de cette thèse. Spécifiquement, en plus de choisir des variantes génétiques qui sont en lien direct avec les cibles pharmacologiques du carvédilol, nous avons aussi inclus un polymorphisme de l' α_2 -ADR. Ce dernier ne fait pas parti des cibles de ce médicament, mais qui tout de même joue un rôle très important, et ce d'une façon indirecte, dans la réponse hémodynamique de ce β -bloqueur. Nous avons ainsi démontré, à l'encontre de plusieurs études effectuées dans le domaine de la pharmacogénétique, l'importance d'étudier plus qu'un gène d'une voie métabolique ou d'un système régulateur lors d'évaluations de ce genre. Si nous

avons procédé de la manière la plus commune, nous aurions ainsi manqué ce résultat si inattendu et provocateur.

CHAPITRE V

Conclusion et Discussion

Il n'existe pas d'évidences d'une forte association entre les variantes génétiques évaluées jusqu'à date et le risque de développer de l'IC. Parmi certaines explications, les résultats actuels suggèrent que, soit le risque de l'IC n'est pas liée aux gènes étudiés, soit que la recherche à ce jour a été insuffisante pour identifier de telles associations, soit que les gènes choisis ne furent pas ceux ayant le plus d'impact ou soit que les études comportaient des erreurs méthodologiques rendant les associations indécélables. Pour l'instant, il semble que les polymorphismes des récepteurs β -adrénergiques et ceux du SRAA ne jouent pas un rôle clair dans la prédisposition à l'IC. Cependant, certains pourraient être considérés comme des facteurs de risque, comme des éléments influençant la progression de la maladie et/ou comme des facteurs modulateurs de la réponse thérapeutiques. Les divergences dans les résultats entre les différentes études sont probablement dues aux critères de sélection des participants et aux différences dans le "background" génétique des échantillons évalués. Il est aussi possible que les polymorphismes étudiés ne sont que des marqueurs en déséquilibre de liaison à proximité des variations génétiques plus pertinentes; ce déséquilibre de liaison peut alors varier d'une étude à l'autre, évoquant des conclusions discordantes. De plus, les polymorphismes évalués interagissent avec d'autres gènes qui eux-mêmes sont polymorphiques. L'interaction gène-gène doublement polymorphique n'étant pas prise en compte pourrait alors être à l'origine des tous ces résultats différents.

Par contre, tenant compte du fait que l'IC est une maladie complexe dont l'étiologie est multifactorielle, un rôle mineur des génotypes investigués contribuant à la pathogénèse de cette maladie, dans des cas spécifiques et en coopération avec d'autres facteurs, ne peut pas être totalement exclu. Par conséquent, la relation entre la variation

généétique et l'IC demeure irrésolue. Toutefois, l'expérience acquise de ces études est énorme et nous devons l'utiliser afin de conceptualiser des essais plus robustes, tant scientifiquement que statistiquement. Pour y arriver, les éléments suivants devront être revus, corrigés et appliqués.

Premièrement, lors d'études cas-témoins impliquant la génétique, il est absolument nécessaire de reconnaître les effets possibles que la stratification de population puisse avoir sur les résultats et les conclusions qu'on en tire. Un assortiment génétique inégal entre les contrôles et les cas entraîne souvent de fausses associations. Une approche proposée pour réduire au minimum ce problème potentiel est de, soit mesurer et d'ajuster pour des marqueurs génétiques qui ne sont pas liées à la maladie sous étude, soit choisir les participants originant d'un même bassin populationnel.

Ensuite, la grande majorité des études effectuées à date était du type cas-contrôle ou des analyses rétrospectives d'essais cliniques n'étant pas conçus *a priori* pour évaluer des portées génétiques. D'ailleurs, une variante génétique pourrait non seulement augmenter significativement le risque de l'IC, mais aussi influencer sa progression, altérer la survie ou moduler la réponse au traitement. Dans des telles circonstances, il est possible que les porteurs d'un allèle à risque souffriront d'IC avancée précocement et mourront prématurément, conduisant à une sous-représentation du génotype de risque au moment du recrutement. Par conséquent, les études prospectives sont nécessaires; du type commun pour évaluer la progression et la réponse au traitement et du type Framingham pour évaluer la prédisposition.

Troisièmement, les critères d'inclusion choisis pour constituer tant le groupe contrôle que le groupe des cas sont à risque d'introduire un nombre substantiel de biais. Par exemple, la grande majorité des études incluent des cas avec une fonction systolique altérée seulement et ce, même s'il y a accumulation de données indiquant qu'un nombre non-négligeable de patients souffre d'IC avec une FEVG normale. De plus, l'inclusion des patients tôt post-IM pourrait introduire des erreurs de classification puisque la revascularisation tardive peut améliorer, et même normaliser, la FEVG et les symptômes d'IC chez les patients avec un myocarde en hibernation. Ce ne sont que quelques exemples, mais des efforts additionnels devront être faits par rapport à d'autres critères de sélection, notamment: la représentation équitables de certains facteurs de risque, le nombre adéquat de femmes, l'âge des participants, etc.

Subséquentement, la majorité des groupes contrôle étaient composés de sujets en santé ou de personnes sans problèmes cardiovasculaires décelables, et ce souvent assortis pour l'âge. Toutefois, la prétention de l'absence de la maladie chez les témoins pourrait conduire à de fausses associations de deux manières. Premièrement, ces sujets pourraient être en fait porteurs d'un allèle protecteur et c'est plutôt la présence de cet allèle qui dicterait les associations versus l'existence d'un allèle à risque. Et deuxièmement, tout patient témoin, surtout lorsqu'il est apparié pour l'âge, pourrait développer la maladie aussitôt que le lendemain de la publication de résultats, ce qui causerait des erreurs de classifications irréparables. C'est dans cette optique que l'utilisation de deux groupes de contrôle suffisamment différents établirait le contraste nécessaire pour détecter des effets génétiques vrais.

Nous avons voulu répondre à plusieurs de ces carences dans nos travaux. Tout d'abord, nous avons présenté une étude comportant deux échantillons contrôle, soit un groupe composé de jeunes volontaires sains et un autre groupe composé des personnes âgées sans maladie cardiovasculaire. Cette étude intitulée "Increased risk of myocardial infarction associated with angiotensin converting enzyme gene polymorphism is age-dependent" démontre comment la présentation de deux groupes contrôles rassure le lecteur au niveau de la validité des résultats. Toutefois, c'est la présence des jeunes volontaires sains comme groupe contrôle qui est un concept novateur. Ainsi, par l'inclusion d'un tel contrôle, nous voulons établir une nouvelle ligne de conduite face à des études génétiques de prédisposition. Deuxièmement, par cette étude, nous avons aussi abordé la notion de la faible pénétrance d'une variante génétique d'une maladie multifactorielle. Ensuite, au lieu d'étudier qu'un gène ou qu'un polymorphisme à la fois, nous avons voulu élargir notre bassin pour incorporer plusieurs points de la voie métabolique du SRAA dans l'étude "Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure". Ce faisant, nous avons pu évaluer certaines interactions gène-gène dans nos analyses. De plus, cette étude fait état des fréquences alléliques et génotypiques des polymorphismes étudiés dans notre population. Cette information peut donc être utilisée comme groupe contrôle dans plusieurs essais futurs. Et finalement, nous avons aussi entamé une étude prospective, une rareté dans ce domaine. Cette étude intitulée "Two adrenergic receptor polymorphisms affect the hemodynamic response to carvedilol in stable heart failure patients" évalue la pharmacogénétique du carvedilol chez des patients en IC. Cet article décrit comment les divers polymorphismes des récepteurs α - et β -adrénergiques modulent

la réponse hémodynamique du carvedilol dans l'IC stable. Nous avons observé des divergences importantes dans ces réponses hémodynamiques au niveau de plusieurs polymorphismes évalués.

En conclusion, diverses études cliniques récentes suggèrent que la présence de certains polymorphismes sélectionnés pourrait, dans certaines situations, prédire l'apparition d'une maladie, prévoir la réponse du patient au traitement pharmacologique ou estimer le pronostic à long terme d'un individu. Ce genre d'études fut facilité par la complétion du projet du génome humain, ainsi que par plusieurs percées technologiques permettant une analyse rapide sur des puces informatiques. On estime que plus de 100 000 polymorphismes et mutations fonctionnels existent dans plus de 30 000 gènes humains. Cependant, la logique dicte que l'ensemble des réponses d'une personne donnée est probablement fondé sur la combinaison de plus d'un génotype. Ainsi, malgré le rôle indispensable de cette nouvelle technologie, une analyse computationnelle sophistiquée sera éventuellement nécessaire afin de pouvoir utiliser les informations actuellement recueillies lors des études d'association, de progression et de pharmacogénétique sur des patients en IC, et d'autres maladies cardiaques. De plus, la recherche de locus de susceptibilité a probablement été compliquée par l'augmentation faramineuse et récente de leur nombre, ainsi que la quantité additionnelle des locus et allèles contributeurs. L'élucidation de la pathogenèse d'un désordre nécessitera donc une investigation quant à leur interrelation et leur importance relative. Il est d'autant plus important de noter ici que les fréquences alléliques et génotypiques varient énormément d'un locus à l'autre dans une population donnée. Il est donc primordial de s'y ajuster en conséquence lorsqu'on

étudie un allèle particulièrement rare. Une étude basant son recrutement sur des critères phénotypiques, comme c'est souvent le cas actuellement, peut donc tomber dans le piège où le nombre des participants porteurs d'un allèle ou génotype spécifique est très faible, rendant ainsi les analyses statistiques, et les conclusions cliniques s'y rattachant, très ardues. Il devient de plus en plus évident que le processus de recrutement doit changer pour incorporer des données génotypiques dans les critères de sélection des participants.

Par contre, une telle approche expérimentale n'est pas dépourvue de certaines limitations et les études impliquant les variances génétiques sont critiquées sur le fait qu'elles n'incorporent pas des données sur l'expression de cibles étudiées. D'autres ajouts revendiqués sont l'inclusion de données para-génétiques, tels l'épigénétique ou la protéomique. Cependant, l'applicabilité de l'approche traditionnelle de gènes candidats est déjà en grande partie limitée par les connaissances existantes au sujet de la biologie du phénotype à l'étude, car l'anatomie moléculaire détaillée de la plupart des traits biologiques demeure inconnue. Il devient donc très délicat d'ajouter des facteurs méconnus à des facteurs qui sont eux-mêmes pas encore totalement élucidés.

De plus, généralement les caractéristiques des traits biologiques proviennent directement d'un certain patron de transcription, et la superposition des traits pour former un phénotype donné est habituellement la conséquence d'une certaine structure du réseau génétique et des paramètres qui contrôlent la dynamique de ce réseau. Dans cette optique, l'analyse de la variation de l'expression génique fournirait des modèles précieux pour étudier des traits complexes et quantitatifs, tel que l'IC. Par contre, il ne faut pas oublier

qu'en plus du patron de transcription inhérent à une pathologie, l'influence des facteurs externes à la pathologie (tel que des facteurs environnementaux par exemple) affectant le processus d'expression des gènes est transmise par des produits des gènes spécifiques (ex. protéines de choc thermique), qui peuvent altérer l'expression des produits des gènes à l'étude. À cela s'ajoute aussi la réalité de l'expression temporelle hétérogène d'un locus qui pourrait alors être, à tort, considérée comme un site candidat.

Il semble donc rapidement évident que l'analyse d'une telle évaluation gonfle exponentiellement en complexité biologique et analytique et qui devient cauchemaresque lorsque vient le temps d'élucider l'amalgame de nouveaux biais qui y sont rattachés. Par ailleurs, des nouvelles limitations resurgiraient questionnant le choix des paramètres à inclure et à exclure d'une évaluation; et tôt ou tard, de peur de manquer un patron de transcription, l'évaluateur est forcé de performer une étude d'association étendue du génome incorporant des données génétiques fonctionnelles, ce qui est pour l'instant trop ardu et coûteux pour être faisable. Néanmoins, le traçage du processus d'expression génétique d'un trait donné, dans des stades et sur des fonds génétiques différentes, avec l'incorporation des voies de signalisation, des réseaux de normalisation et des profils transcriptionnels à l'échelle du génome, peut contribuer à une meilleure compréhension de l'architecture moléculaire globale et de décrypter les indices que des gènes candidats proposent.

Nonobstant, nous devrions nous attendre à ce que les cliniciens futurs choisissent leurs interventions thérapeutiques non seulement en fonction des phénotypes, mais aussi

des génotypes. Le traitement de l'IC cadrerait bien dans cette philosophie. Comme traitement de départ d'IC, les médecins actuels choisissent un IECA ou un β -bloqueur en ne se basant que sur leur propre expérience et intuition. Ils effectuent ensuite un titrage de dose de l'agent choisi avant d'introduire le second. On peut facilement imaginer un moment dans l'avenir lorsque ces décisions seront basées sur le génotype, ce qui permettrait à chaque patient de recevoir un agent spécifique, à une dose spécifique et qui pourra ensuite être augmentée d'une manière spécifique, afin de maximiser les effets bénéfiques de celui-ci, tout en réduisant ses effets indésirables. Plus important encore serait l'opportunité d'identifier les patients à risque de développer une IC afin de commencer le traitement avant l'apparition de dommages irréversibles.

ANNEXE 1

**Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily
medicated heart failure patients.**

publié dans:

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

2010

Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients.

Marcin Zakrzewski-Jakubiak, B.Pharm, M.Sc¹,

Simon de Denus, B.Pharm, M.Sc²,

Marie-Hélène Leblanc, MD, FACC³,

Michel White, MD²,

Jacques Turgeon, Ph.D¹,

Institution:

¹Hôpital Hôtel-Dieu, pavillon Jeanne-Mance, Labo 7-017, 3850 rue Saint-Urbain,
Montréal, Canada, H2W 1T7.

²Montréal Heart Institute, 5000 rue Bélanger, Montréal, Canada, H1T 1C8.

³Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (Hôpital Laval), 2725
chemin Sainte-Foy, Québec City, Québec, Canada, G1V 4G5.

Corresponding Author:

Jacques Turgeon, Ph.D

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,

Hôtel-Dieu, pavillon Masson

3850, Saint-Urbain, room 8-213

Montréal (Québec) H2W 1T7

Keywords: carvedilol, HPLC, enantiomer, stereoselective, plasma

Résumé

Une méthode HPLC simple, spécifique, sensible, rapide et peu coûteuse pour la quantification énantiosélective du carvédilol dans le plasma humain a été développée dans cette étude. Le S(-)- et R(+)-carvédilol et le R (+)-propranolol, comme standard interne, ont été extraites du plasma humain par extraction liquide-liquide en utilisant l'oxyde de tert-butyle. L'énantioséparation a été réalisée sur une colonne Luna 150x2mm 5micron C18 en phase inverse de Phenomenex après dérivation chirale avec le 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC). La phase mobile était constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile. Les pics ont été détectés à l'aide d'un détecteur de fluorescence, où les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 242 et 344nm, respectivement. Les limites de quantification pour le S(-) - et le R(+)-carvédilol ont les deux été de 0.5ng/ml. La variation intra-et inter-jour pour les deux énantiomères a été de moins de 8,3%. La précision pour les deux énantiomères a varié de 91,7 à 104,7%. Cette méthode a été utilisée dans le cadre d'un essai clinique pour doser les énantiomères de carvédilol dans les échantillons de plasma humain obtenus de patients hypermédicamentés souffrant d'insuffisance cardiaque.

Abstract

A simple, specific, sensitive, inexpensive and rapid HPLC method for enantioselective quantification of carvedilol in human plasma was developed in this study. S(-)- and R(+)-carvedilol and R(+)-propranolol as the internal standard were extracted from human plasma by liquid-liquid extraction using methyl *tert*-butyl ether. Enantioseparation was performed on a reverse-phase C18 Phenomenex Luna 5micron 150x2mm column after chiral derivatization with 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate. The mobile phase was a mixture of water and acetonitrile. The peaks were detected using a fluorescence detector, where the excitation and emission wavelengths were set at 242 and 344nm, respectively. The limits of quantification for the S(-)- and R(+)-carvedilol enantiomers were both 0.5ng/ml. Combined intra- and inter-day variations for both enantiomers were less than 8.3%. The combined accuracy for both enantiomers ranged from 91.7 to 104.7%. This method was used to assay the carvedilol enantiomers in human plasma samples obtained from heavily medicated heart failure patients within the framework of a clinical trial.

1. Introduction

Carvedilol (figure 1) is a non-selective β -blocker devoid of intrinsic sympathomimetic activity with an α_1 -adrenergic receptor blocking capability [1]. Carvedilol is administered clinically as a racemic mixture of its R(+)- and S(-)-enantiomers for the treatment of hypertension, ischemic heart disease and heart failure [1]. Each carvedilol enantiomer presents a distinctive pharmacological profile, the β -blocking activity is mainly attributed to the S(-)-enantiomer, whereas both enantiomers exhibit equipotent α -blocking activity [2]. Additionally, each enantiomer displays a unique pharmacokinetic behaviour, where the R(+)-enantiomer attains higher plasma concentrations, bioavailability and protein binding [3]. Thus, it becomes primordial to determine plasma concentrations of both carvedilol enantiomers separately when performing pharmacodynamic or pharmacokinetic clinical trials.

Currently, the enantioselective quantification of carvedilol in human or animal plasma can be obtained by direct HPLC methods using a enantioselective column [4], indirectly following a derivatization with an enantiomerically pure reagent [5-8], using a specialized electrophoretic method [9] or by sophisticated LC-MS/MS assays [10]. However, these methods have various limitations, including time-consuming sample clean-up, laborious extraction steps, prohibitively costly equipment, need for overspecialized technical personnel and inappropriate resolution of carvedilol enantiomers when analysed in a highly medicated patient population.

In this paper we report a simple, cost efficient, accurate and highly specific method for carvedilol quantification in human plasma with the use of a HPLC-fluorescence detector. This method provides great resolution and separation of the carvedilol enantiomers from the many drugs currently used in a heart failure patient population (table 1).

2. Experimental

2.1 Material and chemicals

R,S-(±)-carvedilol, R(+)-carvedilol and S(-)-carvedilol were obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) and were used as a certified reference compound for quantitative analysis. R(+)-propranolol was obtained from MP Biomedicals, LLC (Solon, USA) and was used as an internal standard. The enantiomerically pure chiral agent 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC) was obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Methyl tert-butyl ether (MtBE), acetonitrile, triethylamine (TEA) and sodium hydroxide solutions were used in the extraction procedure and for the mobile phase of the chromatographic process and were acquired from Fisher Scientific (Ottawa, Canada) or J.T.Baker (Phillipsburg, USA).

2.2 Preparation of reagents and stock solutions

The carvedilol pure drug powders were dissolved in methanol to a concentration of 1mg/ml. These solutions were then sequentially diluted with methanol to prepare solutions at concentrations of 0.0125, 0.025, 0.05, 0.25, 1.25, 2.50, 5.00, 7.50 and 10.00µg/ml. R(+)-propranolol powder was dissolved in methanol to a concentration of 1mg/ml and then diluted to a working solution of 10 µg/ml. The GITC powder and the TEA stock solution were prepared daily in acetonitrile to a working concentration of

3mg/ml and 5µl/ml, respectively. An aqueous solution of 1M sodium hydroxide was prepared from the purchased 10M stock solution. Distilled water was further purified with the Barnstead NANOpure ultrapure water system (Thermo Scientific, Dubuque, USA).

2.3 Sample preparation

Carvedilol quantification was determined as follows: 100µl of NaOH (1M) and 30µl of internal standard solution were added to 1ml of plasma. The mix was then vortexed for 10 seconds. After addition of 4ml of MtBE, the tubes were capped and rotated for 20 minutes at 60rpm on a Reax2 rotator (Caframo, Wiarton, Canada). After centrifugation at 3400g for 5 minutes (Sorvall Legent RT centrifuge, Thermo®, Langenselbold, Germany), the tubes were placed in a bath containing CO₂-cooled ethanol in a manner that only the aqueous phase was submerged. After solidification of the aqueous phase, the organic phase was transferred to a new tube and evaporated to dryness under dinitrogen. The dry extract was then dissolved in 80µl of TEA and 20µl of GITC. The tubes were then shaken for 10 minutes at room temperature and the solution was again evaporated to dryness under dinitrogen. The residue in the tubes was reconstituted with 200µl of mobile phase and 20µl of the solution was injected onto the HPLC column.

2.4 Calibration curve

Calibration curves for both carvedilol enantiomers were prepared by adding a known amount of R(+)- and S(-)-carvedilol (0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 40, 50, 75, 100, 125 and 150ng) to 1 ml of blank plasma. Thirty μ l (300ng) of the internal standard was added to each sample. The samples were then extracted as described in section 2.3. All concentration points were performed in duplicate and linearity was assessed by a linear regression analysis.

2.5 Validation of precision and accuracy

For assessing the precision and accuracy of carvedilol enantiomers measurements in plasma, six samples of each enantiomer (at 5 different concentrations: 8, 30, 50, 75 and 100ng/ml) were analyzed within 1 day for assessing intra-day variability, and two samples of each enantiomer (at 5 different concentrations: 8, 30, 50, 75 and 100ng/ml) on five consecutive days for assessing inter-day variability. The accuracy was obtained by determining the agreement between the results obtained experimentally and the real values of the enantiomers in the samples. The recoveries of carvedilol enantiomers were determined by comparison of the ratios of the peak areas obtained after extraction from plasma to the ratios of the peak areas obtained after the procedure of direct derivatization of the standard solutions.

2.6 Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC system consisted of the following Thermo Electron SpectraSYSTEM (San Jose, USA) equipment: the P4000 quaternary gradient pump, the AS3000 variable-loop autosampler equipped with a shielded column oven, the FL3000 fluorescence detector and the SN4000 computer-linked data processor. The data were analysed with the ChromQuest 4.2.34 (ver. 3.1.6) software. Separation was achieved with a reverse-phase C-18 Phenomenex Luna 5micron 100A 150x2mm column (Torrance, USA). A 4cm extension link equipped with a 2mm C-18 SecurityGuard Cartridge (Phenomenex, Torrance, USA) was used as a guard column. The mobile phase consisted of a water:acetonitrile mixture at a ratio of 60:40 for the first 10 minutes of the chromatographic run, after which the ratio was changed to 50:50. The aforementioned switch from 60:40 to 50:50 in the mixture ratio lasted 6 seconds and the run was allowed to pursue for a total time of 30 minutes. The flow rate was constant at 0.5ml/min. The excitation and emission wavelengths were set at 242 and 344nm, respectively. The temperature of the column oven was set at 50°C.

2.7 Application

The carvedilol enantiomer concentrations were determined in 59 heavily medicated heart failure patients within the framework of a clinical trial. All participating patients were at steady state, for they had to be taking the same carvedilol dose for a minimum period of one month. Subsequently, the patients had to withhold their

carvedilol intake for 24 hours before presenting themselves at the heart failure clinic, whereas the patients' other medications were taken as usual (table 1). Blood samples were drawn at two points: the first, before the intake of their usual carvedilol dose and the second, 110 minutes later. The blood samples were centrifuged at 2000g for 10 minutes at room temperature and the obtained plasma was stored at -20°C until analysis. This study was approved by the Montreal Heart Institute Ethical Review Board and all patients signed the written informed consent form to participate.

3. Results and discussion

3.1 Chromatography

The retention times of S(-)- and R(+)-carvedilol and the internal standard were 20.1, 21.4 and 23.4 minutes, respectively (figure 2A). No other peaks corresponding to these retention times were noted on the chromatograms for either the drug-free blank plasmas or the heart failure patients' samples.

We judged this method to be fast, simple and relatively inexpensive when compared to methods using a solid-phase extraction. In this liquid-liquid extraction, MtBE was used as the extraction solvent and had the distinct advantage over dichloromethane and chloroform in having a density that is below that of water. As such, separation of the organic phase from the aqueous phase during the extraction is much faster and more precise, especially if the freeze method is employed. R(+)-propranolol was chosen over R- or S-metoprolol, R- or S-atenolol or R- or S-acebutolol as the internal standard, because it showed no interference with the carvedilol enantiomers peaks, nor did it show up too early on the chromatographic run where the patients' other medications were expected to be revealed. In addition, R(+)-propranolol is an easily obtainable product, it is relatively inexpensive and it has a good fluorometric resolution.

3.2 Linearity and limit of quantification

The standard curves for both the S(-)- and the R(+)-carvedilol were constructed by plotting the peak area ratio of the given carvedilol enantiomer to R(+)-propranolol on the Y-axis and the concentration of the given carvedilol enantiomer on the X-axis. Excellent linearity was noted within the range 0.5-150ng/ml with the coefficient of correlation (r^2) of >0.99 for both the S(-)- and the R(+)-carvedilol. The limit of quantification was 0.5ng/ml for both enantiomers.

3.3 Precision, accuracy and recovery

Intra- and inter-day precision and accuracy were determined by quality control samples at various concentrations as described in section 2.5. The intra-day precision (%C.V) was found to be less than 7.0 and 4.7% for the S(-)- and R(+)-carvedilol, respectively, and the accuracy ranged from 92.0 to 103.6% and 92.3 to 98.8% for the S(-)- and R(+)-carvedilol, respectively. The inter-day precision (%C.V.) was found to be less than 7.3 and 8.3% for the S(-)- and R(+)-carvedilol, respectively, and the accuracy ranged from 91.7 to 99.7% and 93.0 to 104.5% for the S(-)- and R(+)-carvedilol, respectively (table 2). The recoveries of S(-)- and R(+)-carvedilol in plasma were 84% and 88% at 15ng/ml, respectively.

3.4 Racemisation

The stability of derivatized carvedilol extracted from human plasma was assessed within the framework of standard curve acquisition by re-injection of each separate carvedilol-GITC diastereoisomer after storage at room temperature for 24 hours post plasma extraction. The accuracy, precision and sensitivity of these samples were found to be acceptable on re-injection, indicating that the processed extracts were stable stored at room temperature for 24 hours. Racemisation was characterized on the chromatograph as the emergence of the opposed enantiomer's peak from the one being injected, and was deemed insignificant at less than one percent. The latter was actually attributed to the slightly less than perfect purity of each carvedilol enantiomer obtained from the manufacturer, rather than racemisation. Additionally, storage stability of carvedilol in human plasma has been studied previously [10]. Carvedilol is stable in spiked human heparin plasma at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 30 months. Ex vivo stability of carvedilol in authentic human plasma samples is acceptable upon storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 40 months. Carvedilol is also stable in human plasma after at least three freeze–thaw cycles from $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Carvedilol enantiomer concentrations in plasma of the heart failure patients

The method developed in this study was applied for determination of concentrations of the S(-)- and R(+)-carvedilol enantiomers in plasmas of 59 heart failure patients. An example of a HPLC chromatogram of one such patient is provided in figure 2B. This patient took a PO dose of 6.25mg of racemic carvedilol. The aforementioned HPLC chromatogram corresponds to a blood sample taken around two hours post-dose

administration. The evaluated plasma concentrations in this case were 10.0 and 38.1 ng/ml for the S(-)- and R(+)-carvedilol, respectively. Moreover, this patient was also treated with enalapril, warfarin, acetylsalicylic acid, atorvastatin, amiodarone, furosemide, spironolactone, gliclazide and pantoprazole; as assessed from the chromatogram, no interference of these drugs with the carvedilol enantiomers' determination can be noted. We obtained similar results for the 58 other heart failure patients tested. Although the list of drugs used by the patient population was extensive, no interference was noted on the HPLC chromatograms.

Hereupon lays the major advantage in developing this assay (table 3). Since we had no prior knowledge of the patients' medication list at the time of their recruitment to the clinical study, we had to develop a dosing method that would minimise the risk of potential chromatographic interference. Hence, relying on the previously published methods was not an option. Although Peccinini et al. [6] did provide a short list of medications that did not interfere with their quantification of carvedilol enantiomers, we judged the elution distance of both enantiomers from the internal standard a bit too long, a factor possibly increasing the likelihood for interference. Moreover, the method developed by Peccinini et al. [6] did not achieve a complete enantiomer resolution on their chromatograph, as assessed by the failure of the chromatographic run to reach the baseline value when separating the two carvedilol enantiomers. Conversely, Saito et al. [4], which did attain a good enantiomer resolution on their chromatograph, had an exceptionally long elution time of the two enantiomers combined with the internal standard. Indeed, each of those molecules took approximately three minutes to elute for a

total of nine minutes, which represented almost half of the total chromatographic run. Such an assay would fare very well for a pharmacokinetic clinical trial involving healthy volunteers where interference from other pharmacologic entities is held to a minimum.

Explicitly, a heart failure patient is known to take many drugs concurrently. Therefore, by default, there are many more molecules that could potentially interfere with carvedilol quantification as compared to a method performed on healthy volunteers or patients with less severe conditions. Secondly, the fact that clinical trials need to be “blinded”, demonstrates the full blown problem any pharmacokinetic study will face when quantifying carvedilol in those patients. Basically, we know that a specific patient plasma sample contains many other molecules, but we do not know what they are and when they will elute on a chromatogram. When applying those two notions, one can easily visualize that the shorter a chromatographic run is, the more all those molecules are clustered into a smaller area, thereby increasing the chance of an interference of occurring. The latter explains the necessity and the requirement of our longer chromatographic run than is usually seen in other assays. Furthermore, one can not ignore the fact that an interference could also occur with the internal standard. Here, choosing the right internal standard so that it elutes rather close to the main molecule would seem as an advantage. This may not be easily perceived at first, however, for an internal standard to elute close to the main molecule, it would have to share a lot of the main molecule’s molecular properties. And in contrast, the further the internal standard elutes from the main molecule, the lesser its resemblance to the main molecule, the closer its

resemblance to any other molecule that may be present, and the greater its chance to elute close to that other molecule to create interfered-upon unusable results.

Correspondingly, on the basis of its physicochemical principle, the ideal method for specific resolution of an entity would be to use a mass spectrum-linked liquid chromatography (LC-MS/MS). However, the need for costly specialized equipment and the necessity of highly trained personnel made this choice unattainable in our laboratory setting. We present in table 3 how our method fares against other assays that also stereoselectively quantify racemic carvedilol.

4. Conclusion

A simple, specific, sensitive, inexpensive and rapid HPLC method for enantioselective determination of carvedilol in human plasma was developed in this study. However, the major advantage of this method lies in its selective quantification of carvedilol enantiomers from human plasma tainted with many other pharmacological entities. The present method will be useful for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of carvedilol enantiomers in heavily medicated patients, such as those affected with heart failure, hypertension or other cardiovascular ischemic conditions.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) & Heart and Stroke Foundation of Canada.

Role of the funding source

The funding source had no involvement in any of the following: the study design; the collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; and the decision to submit the paper for publication.

Duality of Interest

MZ has no conflict of interest to declare. SdD has no conflict of interest to declare. ML has no conflict of interest to declare. MW has no conflict of interest to declare. JT has no conflict of interest to declare.

Submission declaration

All authors solemnly declare that this work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Table Legends

Table 1: Concomitant drug intake by the studied heart failure population

Table 2: Intra- and inter-day precision and accuracy of S(-)- and R(+)-carvedilol in this
HPLC assay

Table 3: Comparison of various assays for the enantioselective quantification of
carvedilol in plasma

Table 1: Concomitant drug intake by the studied heart failure population

allopurinol	cypheptadine	formoterol	lisinopril	pantoprazole	salbutamol
amiodarone	desipramine	fosinopril	losartan	perindopril	simvastatin
amlodipine	digoxin	gliclazide	lovastatin	pravastatin	sipiro lactone
atorvastatin	enalapril	glimepiride	metformin	primidone	sotalol
budesonide	ezetimibe	glyburide	methotrexate	propafenone	tamsulosin
candesartan	fenofibrate	hydralazine	metolazone	quinapril	trandolapril
chlorpromazine	finasteride	hydroxychloroquine	niacin	quinidine	trazodone
clonazepam	fluoxetine	ipratropium	nitroglycerine	ramipril	valsartan
clopidogrel	flurazepam	isosorbide mononitrate	omeprazole	repaglinide	warfarin
colchicine	fluticasone	levothyroxine	oxazepam	rosuvastatin	

Table 2: Intra- and inter-day precision and accuracy of S(-)- and R(+)-carvedilol in this HPLC assay

Enantiomer concentration of carvedilol in plasma (ng/ml)	S(-)-carvedilol				R(+)-carvedilol			
	Intra-day		Inter-day		Intra-day		Inter-day	
	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy	Precision	Accuracy
	(%C.V.)	(%)	(%C.V.)	(%)	(%C.V.)	(%)	(%C.V.)	(%)
8	7.0	92.0	5.8	91.7	2.3	92.3	8.3	93.0
30	4.8	103.6	5.1	93.0	4.5	98.8	3.2	97.0
50	1.2	98.3	7.3	94.9	4.7	95.8	3.3	101.5
75	2.8	100.1	3.8	99.7	3.2	98.3	2.0	104.5
100	2.1	101.3	3.6	95.0	4.5	95.3	2.2	98.8

Table 3: Comparison of various assays for the enantioselective quantification of carvedilol in plasma

Method	Advantages	Disadvantages
Saito et al. [4] (chiral solid phase → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • no need for chiral derivatization • good enantioselective separation • good sensitivity (0.5ng/ml) • small sample volume needed 	<ul style="list-style-type: none"> • lengthy column preconditioning • use of complex solutions for the extraction • too wide enantioselective separation (increased risk for interference from other drugs when applied in a clinical setting) • more expensive • narrow range of linearity (0.5-50ng/ml)
Eisenberg et al. [5] (derivatization with GITC → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • good sensitivity (0.6ng/ml) • good enantioselective separation 	<ul style="list-style-type: none"> • need for derivatization • costly extraction material • narrow range of linearity (0.6-80ng/ml) • larger sample volume used • long distance between the analytes and the internal standard on the chromatogram (increased risk for interference from other drugs when applied in a clinical setting)

Peccinini et al [6] (derivatization with menthyl chloroformate → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • wide range of linearity (0.5-200ng/ml) • good sensitivity (0.5ng/ml) • fast derivatization procedure 	<ul style="list-style-type: none"> • need for derivatization • extraction with chloroform • long distance between the analytes and the internal standard on the chromatogram • incomplete enantioselective separation
Spahn et al [7] (derivatization with S-(+)- naproxen chloride → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • good sensitivity • good enantioselective separation 	<ul style="list-style-type: none"> • need for derivatization • lengthy derivatization procedure • larger sample volume used • long distance between the analytes and the internal standard on the chromatogram
Stahl et al [8] (derivatization with R-(+)- phenylethyl isocyanate → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • good sensitivity • good enantioselective separation 	<ul style="list-style-type: none"> • need for derivatization • lengthy derivatization procedure • larger sample volume used • long distance between the analytes and the internal standard on the chromatogram

Yang et al [10]	<ul style="list-style-type: none"> • very fast run time 	<ul style="list-style-type: none"> • need for specialized equipment
(derivatization with GITC → HPLC-MS/MS detection)	<ul style="list-style-type: none"> • very good sensitivity (0.2ng/ml) • very good specificity • wide range of linearity (0.2-200ng/ml) • good enantioselective separation 	<ul style="list-style-type: none"> • need for highly trained personnel • prohibitively expensive • need for derivatization
Our method	<ul style="list-style-type: none"> • good sensitivity (0.5ng/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> • need for derivatization
(derivatization with GITC → HPLC with fluorescence detection)	<ul style="list-style-type: none"> • good specificity against numerous drugs • good enantioselective separation • wide range of linearity (0.5-200ng/ml) • fast, cheap and simple extraction 	<ul style="list-style-type: none"> • larger sample volume used • longer run time (by necessity)

Figures Legends

Figure 1: Scheme of derivatization of carvedilol with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)

Figure 2: A. HPLC chromatogram of 100ng/ml S(-)-carvedilol (1), 100ng/ml R(+)-carvedilol (2) and 300ng/ml R(+)-propranolol (3) from a spiked blank plasma. B. HPLC chromatogram of 10.0ng/ml S(-)-carvedilol (1), 38.1ng/ml R(+)-carvedilol (2) and 300ng/ml R(+)-propranolol (3) from a heart failure patient's plasma sample.

Figure 1: Scheme of derivatization of carvedilol with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)

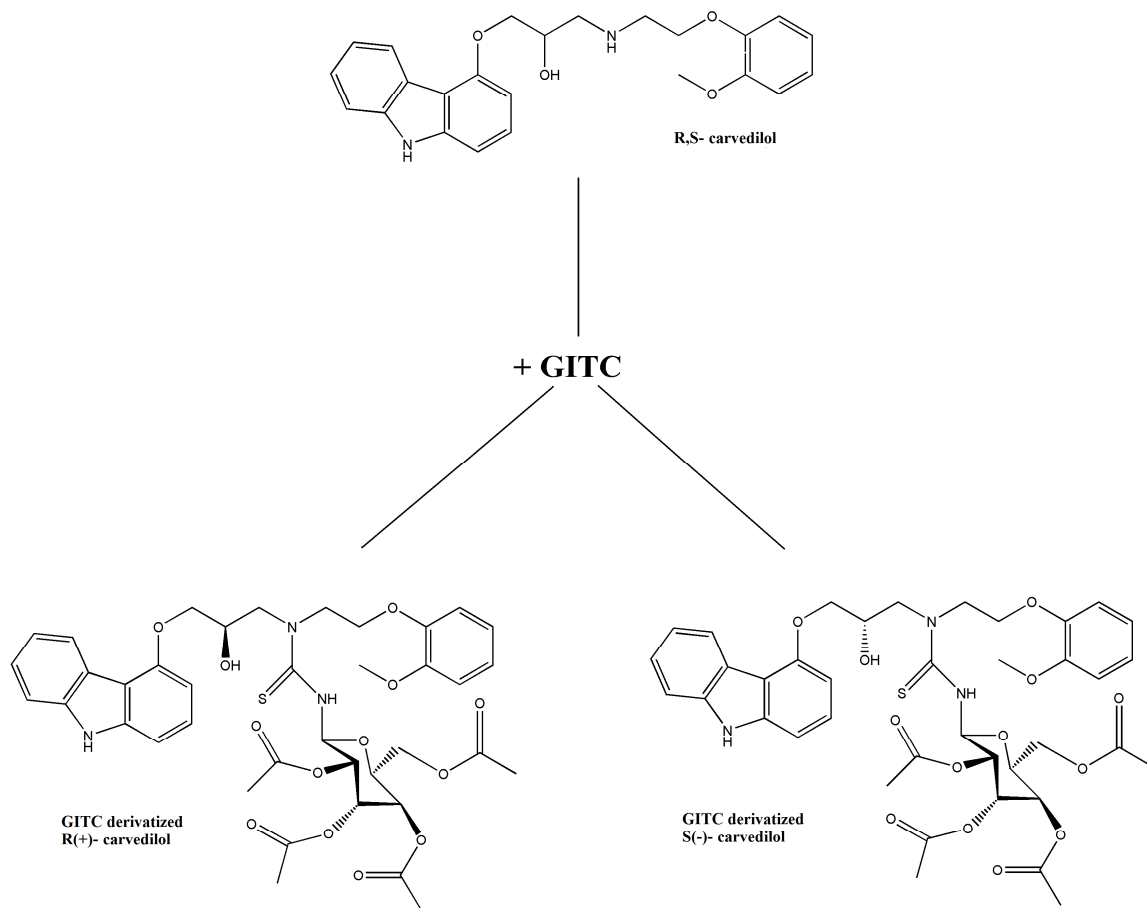
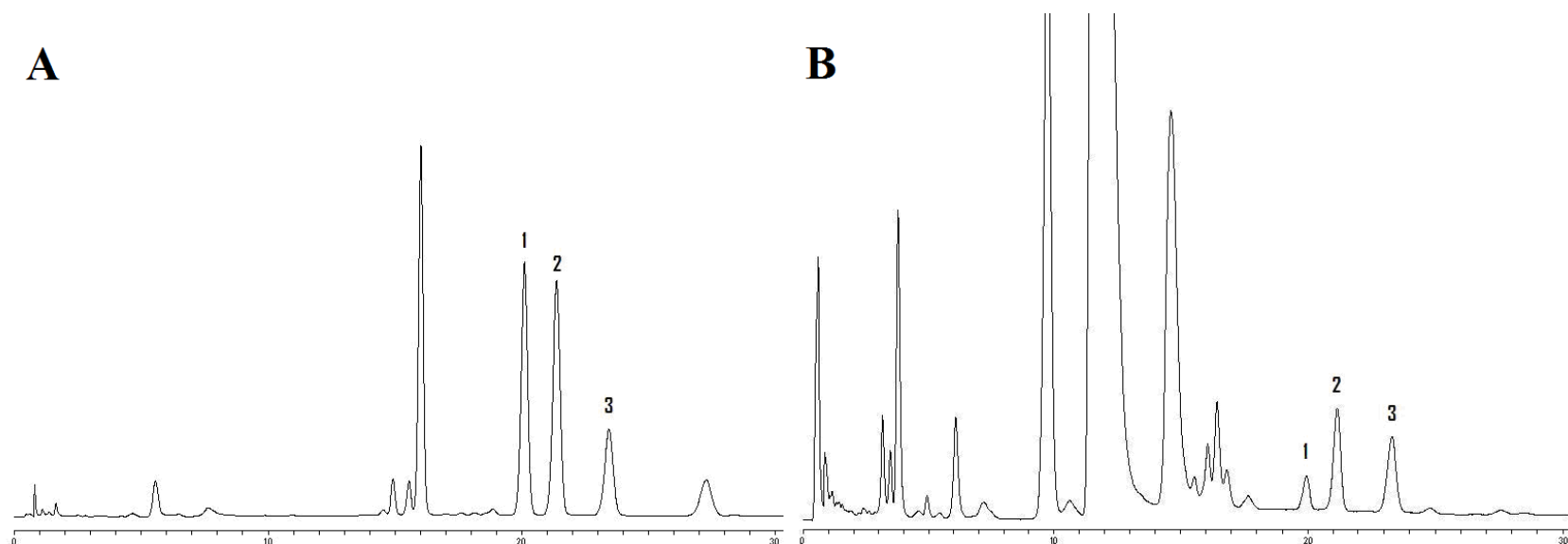


Figure 2: A. HPLC chromatogram of 100ng/ml S(-)-carvedilol (1), 100ng/ml R(+)-carvedilol (2) and 300ng/ml R(+)-propranolol (3) from a spiked blank plasma. B. HPLC chromatogram of 10.0ng/ml S(-)-carvedilol (1), 38.1ng/ml R(+)-carvedilol (2) and 300ng/ml R(+)-propranolol (3) from a heart failure patient's plasma sample.



References

- [1] W.H. Frishman, Carvedilol. *N Engl J Med* 339 (1998) 1759-65.
- [2] K. Stoschitzky, G. Koshucharova, P. Lercher, R. Maier, A. Sakotnik, W. Klein, P.M. Liebmann, and W. Lindner, Stereoselective effects of (R)- and (S)-carvedilol in humans. *Chirality* 13 (2001) 342-6.
- [3] G. Neugebauer, W. Akpan, B. Kaufmann, and K. Reiff, Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound. *Eur J Clin Pharmacol* 38 Suppl 2 (1990) S108-11.
- [4] M. Saito, J. Kawana, T. Ohno, M. Kaneko, K. Mihara, K. Hanada, R. Sugita, N. Okada, S. Oosato, M. Nagayama, T. Sumiyoshi, and H. Ogata, Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 843 (2006) 73-7.
- [5] E.J. Eisenberg, W.R. Patterson, and G.C. Kahn, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its O-desmethyl metabolite in human plasma after chiral derivatization. *J Chromatogr* 493 (1989) 105-15.
- [6] R.G. Peccinini, V.F. Ximenes, E.J. Cesarino, and V.L. Lanchote, Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma and urine using HPLC after chiral derivatization. *Biopharm Drug Dispos* 29 (2008) 280-8.

- [7] H. Spahn, W. Henke, P. Langguth, J. Schloos, and E. Mutschler, Measurement of carvedilol enantiomers in human plasma and urine using S-naproxen chloride for chiral derivatization. *Arch Pharm (Weinheim)* 323 (1990) 465-9.
- [8] E. Stahl, E. Mutschler, U. Baumgartner, and H. Spahn-Langguth, Carvedilol stereopharmacokinetics in rats: affinities to blood constituents and tissues. *Arch Pharm (Weinheim)* 326 (1993) 529-33.
- [9] L. Clohs, and K.M. McErlane, Comparison between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the stereoselective analysis of carvedilol in serum. *J Pharm Biomed Anal* 31 (2003) 407-12.
- [10] E. Yang, S. Wang, J. Kratz, and M.J. Cyronak, Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization. *J Pharm Biomed Anal* 36 (2004) 609-15.

ANNEXE 2

Effects of AGTR1 A1166C Gene Polymorphism in Patients with Heart Failure Treated with Candesartan.

publié dans:

The Annals of Pharmacotherapy

2008 Jul;42(7):925-32.

**Effects of AGTR1 A1166C Gene Polymorphism in Patients with Heart Failure
Treated with Candesartan.**

Simon de Denus, Marcin Zakrzewski-Jakubiak, Marie-Pierre Dubé, François Bélanger,
Serge Lepage, Marie-Hélène Leblanc, Denis Gossard, Anique Ducharme, Normand
Racine, Lucette Whittom, Joel Lavoie, Rhian M Touyz, Jacques Turgeon, and Michel
White.

Simon de Denus BPharm MSc, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, University of
Montreal/Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada

Marcin Zakrzewski-Jakubiak BPharm MSc, PhD Student, Faculty of Pharmacy,
University of Montreal

Marie-Pierre Dubé PhD, Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of
Montreal/Montreal Heart Institute

François Bélanger MSc, Laboratory Coordinator, Centre hospitalier de l'Université de
Montréal Research Centre

Serge Lepage MD, Professor, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of
Sherbrooke/Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, QC

Marie-Hélène Leblanc MD FACC, Clinical Associate Professor, Hôpital Laval, Laval,
QC

Denis Gossard MD, Cardiologist, Hôpital du Haut-Richelieu, Saint-Jean-sur-Richelieu,
QC

Anique Ducharme MD MSc, Director, Heart Failure Clinic, Montreal Heart Institute;
Associate Professor of Medicine, Department of Medicine, University of Montreal

Normand Racine MD, Chief, Department of Medicine and Cardiology, Montreal Heart
Institute; Associate Professor of Medicine, Department of Medicine, University of
Montreal

Lucette Whittom RN BSc, Project Leader, Montreal Heart Institute

Joel Lavoie PhD, Clinical Biochemist; Director, Biochemistry Laboratory, Montreal
Heart Institute

Rhian M Touyz MD PhD, Senior Scientist, Kidney Research Centre, University of
Ottawa, Ottawa Health Research Institute/Professor, Department of Medicine, University
of Ottawa, Ottawa, ON

Jacques Turgeon PhD, Director, Centre hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre; Professor, Faculty of Pharmacy, University of Montreal

Michel White MD, Director, Heart Failure Research Program, Montreal Heart Institute; Professor of Medicine, Department of Medicine, University of Montreal

The main trial was sponsored by Astra-Zeneca Canada.

Drs. de Denus and White have received research funding and speaker fees from AstraZeneca.

Part of this work was presented as a poster at the 2005 Canadian Cardiovascular Society meeting.

Résumé

Les bénéfices des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (BRA) chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (IC) traités avec une thérapie standard, incluant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECA) de l'angiotensine, ont été démontrés dans le cadre de deux études contrôlées à répartition aléatoire. Cependant, il est présentement impossible de déterminer quels patients bénéficieront le plus de l'addition d'un BRA. L'objectif de cette étude fût d'explorer l'impact de certains polymorphismes génétiques sur les effets hémodynamiques, neurohormonaux, et anti-inflammatoires du candésartan chez des patients souffrant d'IC et déjà sous traitement avec un IECA.

Une étude pharmacogénétique a été conduite en marge d'une plus large étude multicentrique évaluant les bénéfices du candésartan chez des patients souffrant d'IC et traités avec un IECA. La dose de départ de 4 ou 8 mg de candésartan était augmentée de façon progressive à toutes les 2 semaines pour atteindre 32 mg après 8 semaines. Le lien entre les changements observés après 2 et 24 semaines de traitement au niveau de la tension artérielle, du peptide natriurétique N-terminal de type proBNP (NT-proBNP) et de la protéine C réactive à haute sensibilité (hsCRP) et la présence ou l'absence des polymorphismes cibles a été évalué par analyse de variance en utilisant la dose du candésartan comme co-facteur.

Trente et un patients recevant du candésartan ont participé à cette étude. Après deux semaines de traitement, seul le polymorphisme AGTR1 A1166C corrélait avec un changement de la tension artérielle. En comparaison avec les porteurs AC (n = 18), les

porteurs homozygotes A1166 ($n = 13$) démontraient une plus grande baisse de la tension systolique (-9.1 ± 4.7 vs 1.1 ± 3.3 mm Hg; $p = 0.04$) et diastolique (-5.1 ± 1.5 vs 1.9 ± 1.9 mm Hg; $p = 0.005$). Après 6 mois de traitement, aucun des polymorphismes cibles n'était significativement associé avec la baisse de tension artérielle observée. Cependant, les porteurs AC ont démontré une plus grande baisse du NT-proBNP (-151.4 [-207 ; -19.8] ng/L vs 147.3 [-61.3 ; 882.9] ng/L; $p = 0.03$) et de la hsCRP (-0.8 [-2.2 ; -0.03] mg/L) vs 0.2 [-1.8 ; 5.3] mg/L; $p = 0.09$) que les porteurs AA. Aucune autre association significative n'a été observée.

Les résultats de cette étude exploratoire démontrent que le polymorphisme AGTR1 A1166C peut influencer la réponse au candésartan (les porteurs AC pouvant nécessiter des doses plus élevées) chez les patients IC recevant des IEC. La validation de ces résultats chez un plus grand nombre de sujets est nécessaire avant d'utiliser le génotype AGTR1 A1166C en pratique médicale.

Abstract

BACKGROUND: The benefits of angiotensin II receptor blockers (ARBs) in patients with heart failure who are treated with standard pharmacotherapy, including an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, were demonstrated in 2 large randomized trials. It is currently impossible to determine which patient will benefit from the addition of an ARB.

OBJECTIVE: To explore the impact of selected candidate genes on the hemodynamic, neurohormonal, and antiinflammatory effects of candesartan in patients with heart failure who are already being treated with an ACE inhibitor .

METHODS: We investigated the impact of 10 candidate genetic polymorphisms on the effects of candesartan in patients with heart failure who are treated with an ACE inhibitor. We evaluated their impact on acute (2 wk) and long-term (24 wk) changes in blood pressure and N-terminal proB-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) during treatment with candesartan.

RESULTS: Thirty-one patients were included. Homozygotes of the AGTR1 A1166 allele (n = 13) had a greater decrease in systolic (-9.1 ± 4.7 vs 1.1 ± 3.3 mm Hg; $p = 0.04$ by analysis of variance [ANOVA], adjusting for dose) and diastolic blood pressure (-5.1 ± 1.5 vs 1.9 ± 1.9 mm Hg; $p = 0.005$ by ANOVA, adjusting for

dose) compared with C1166 allele carriers (n = 18) following 2 weeks of treatment. After 6 months of treatment, C1166 carriers experienced a greater decrease in NT-proBNP (−151.4 [−207; −19.8] ng/L vs 147.3 [−61.3; 882.9] ng/L; p = 0.03) and hsCRP (−0.8 [−2.2; −0.03] mg/L) vs 0.2 [−1.8; 5.3] mg/L; p = 0.09) compared with patients carrying the AA1166 genotype. No other significant association was found.

CONCLUSIONS: The results of this proof-of concept study provide the first evidence that the AGTR1 A1166C polymorphism could influence the response to candesartan in patients with heart failure who are receiving ACE inhibitors. Validation of these exploratory findings in larger populations is required before use of the AGTR1 A1166C genotype can be incorporated into clinical practice.

KEY WORDS: angiotensin, candesartan, heart failure, pharmacogenetics.

1. Introduction

The importance of angiotensin II in the pathophysiology of heart failure is well established (1). Although angiotensin- converting enzyme (ACE) inhibitors are effective in reducing angiotensin II synthesis acutely in patients with heart failure, concentrations eventually return to pretreatment levels (2). Because of this phenomenon, it has been hypothesized that a dual blockade of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) with angiotensin II receptor blockers (ARBs) and ACE inhibitors may have additional beneficial effects in patients with heart failure. Such a strategy would also maintain the benefit of bradykinin accumulation produced by ACE inhibition (1). These potential benefits of dual angiotensin II suppression were demonstrated in 2 large randomized trials (3, 4). However, not all patients showed benefit from the addition of an ARB. It is currently difficult to predict which patients with heart failure will benefit from pharmacotherapy with both an ACE inhibitor and an ARB. Current data suggest an important heritability to heart failure (5). Similarly, the degree of RAAS activity also appears to be heritable (6). Numerous genetic polymorphisms related to the RAAS have been identified. Amongst these, many influence its activity and/or have been associated with the development and/or prognosis of heart failure. These genetic variations could influence the response to pharmacologic modulation of the RAAS (7). However, pharmacogenetic studies aimed at evaluating whether these markers are useful in identifying patients who are most likely to benefit from dual angiotensin II suppression with an ACE inhibitor and an ARB, such as candesartan, have not yet been published. It is now well accepted that translational pharmacogenetic research is a multistep process

that requires initial small proof-of-concept studies that lead to larger, more definitive, validation studies (8). The objective of this exploratory proof-of-concept study was to evaluate whether selected genetic polymorphisms related to the RAAS could predict the hemodynamic, neurohormonal, and antiinflammatory response to candesartan in patients with heart failure who are receiving an ACE inhibitor.

2. Methods

STUDY DESIGN

We conducted a pharmacogenetic substudy of patients included in a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating the effects of candesartan on selected biomarkers in patients with stable systolic heart failure treated with an ACE inhibitor (9).

PATIENTS

Patients enrolled in the pharmacogenetic substudy signed an informed consent form specific to that study that was approved by all participating centers, in addition to the informed consent form signed to participate in the main trial. The current report focuses strictly on patients randomized to the candesartan treatment group. Of the 33 patients who agreed to participate in this genetic substudy and who were randomized to receive candesartan, 2 stopped candesartan before the first follow-up visit. Because no on-treatment hemodynamic follow-up data were available at the first follow-up visit for these patients, they were not included in the present analyses. Patients included in the main trial were 18 years of age or older, had symptomatic heart failure of New York Heart Association (NYHA) functional Classes II–IV for 3 or more months prior to randomization to the candesartan or placebo groups, and had a documented left

ventricular ejection fraction (LVEF) less than or equal to 40% within the previous 6 months. Patients were treated with an optimal dose of an ACE inhibitor, in the opinion of the investigator, for at least 1 month. Patients were also required to be on a stable dose of a β -blocker, unless contraindicated or not tolerated, for at least 1 month prior to enrollment.

STUDY TREATMENT

In the treatment group, candesartan was initiated at a dose of 4 or 8 mg once daily, at the discretion of the investigator. Both candesartan and placebo were provided by the sponsor of the main trial, Astra-Zeneca Canada. Patients underwent a designated titration every 2 weeks to a target dose of 32 mg once daily over 8 weeks, or to the maximum tolerated dose if this target dose could not be achieved. Patients were treated for a total of 24 weeks.

GENETIC POLYMORPHISMS

Because of the small number of patients who were expected to participate in this pharmacogenetic substudy, we limited our study to 10 genetic polymorphisms in 8 genes with high allele frequencies. Candidate genes were selected based on their previous association with response to ARBs in hypertensive patients (10-12), or because of their potential contribution to RAAS activity (13, 14) or the physiopathology of heart failure (15, 16). The following gene polymorphisms were tested: ACE I/D, angiotensinogen

(AGT) Met235Thr and Thr174Met, angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) A1166C, aldosterone synthase (CYP11B2) C344T, +9/-9 insert/deletion polymorphism of exon 1 of the bradykinin B2 receptor (BDKRB2), α -adducin (ADD1) Gly460Trp, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298Asp, and T786C and β 2-adrenergic receptor (ADRB2) Gln27Glu. Blood samples for the pharmacogenetic substudy were obtained at any time during the study or after its completion. A blood sample (7 mL) was collected in an ethylenediaminetetraacetic acid-containing tube and was kept at room temperature until DNA was isolated. DNA was extracted from whole blood by the GenElute Blood Genomic DNA Kit (NA2000 Sigma). Extracted DNA was stored at -20°C until genotyping was performed. The studied gene polymorphisms were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and processed by restriction enzymes (when needed), as previously described (17-26). The PCR products obtained were then analyzed by electrophoresis on agarose gels and visualized by ethidium bromide staining under an ultraviolet reflective light. Because the AGTR1 A1166C was not in Hardy-Weinberg equilibrium, all patients who had remaining DNA (25 of 31) were genotyped according to an additional technique (27) to exclude the possibility of a recurrent genotypic error. In all cases, genotyping results were concordant.

ENDPOINTS

We evaluated the relationship between the 10 gene polymorphisms and the acute (2 wk) changes in systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) and the

long-term changes in blood pressure (24 wk), N-terminal proB-type natriuretic peptide (NT-proBNP; the primary endpoint of the main trial), and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) during treatment with candesartan (9). Blood pressure was measured after the patient was seated for at least 5 minutes and was repeated after 5 minutes. The average of these 2 measurements was used in our analyses. Blood samples for NT-proBNP and hsCRP were taken in fasting patients after 20–30 minutes of rest in a calm environment after insertion of a peripheral intravenous catheter. The samples were stored at -80°C until analyzed. Levels of NT-proBNP were measured by immunoassay using the Roche Elecsys 2010 Analytic analyzer. Levels of hsCRP were measured using the Dade Behring High Sensitivity CRP assay (Dade Behring Diagnostics, Marburg, Germany).

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous data are presented as mean \pm SE or median (25th to 75th percentiles) where appropriate, and categorical variables are presented as percentages. Data analysis was performed using SAS version 9.1.3 (Cary, NC) and NCSS statistical analysis software 2004 (Kaysville, UT). The χ^2 goodness-of-fit test was used to test markers for Hardy-Weinberg equilibrium. One-way analysis of variance (ANOVA) tests were conducted to test for genotype main effects and linear contrast. Factorial ANOVA tests were used to categorize blood pressure response between the first and second visit by genotypes and by candesartan doses using a one-way model to test for main effects and

linear contrasts. Given the exploratory nature of this pharmacogenetic substudy, p values are presented as a rank order (from lowest to highest). To control for potential confounders, factorial ANOVA tests were conducted. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

A total of 31 patients were included in the analysis. Detailed baseline information of the study population is presented in Table 1. All patients were white and mainly male, and the majority had heart failure caused by coronary artery disease. Patients had either NYHA functional class symptoms II or III, and all were receiving an ACE inhibitor and a β -blocker at baseline. Genotype frequencies for all gene polymorphisms are reported in Table 2. All gene polymorphisms, except for the AGTR1 A1166, were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.023$).

SHORT-TERM EFFECTS

Genetic polymorphisms are presented in a rank order of significance of their association with 2-week changes in blood pressure in Table 3. Of the 10 gene polymorphisms studied, only the AGTR1 A1166C was related to the 2-week changes in blood pressure. Compared with AC carriers, A1166 homozygotes had a significantly greater decrease in SBP (-9.1 ± 4.7 vs 1.1 ± 3.3 mm Hg; $p = 0.04$ by ANOVA, adjusting for dose) and DBP (-5.1 ± 1.5 vs 1.9 ± 1.9 mm Hg; $p = 0.005$ by ANOVA, adjusting for dose) blood pressure at 2 weeks. There were no significant differences between AC1166 carriers and AA1166 carriers at baseline in the percentage of patients receiving a β -blocker, an ACE inhibitor, furosemide, or spironolactone; baseline ACE inhibitor dosage; NTproBNP and hsCRP concentrations; or DBP. The only significant differences we observed were

regarding age and SBP. After adjusting for age and the dose of candesartan, the association between AGTR1 and changes in both SBP ($p = 0.02$) and DBP ($p = 0.003$) remained significant. To adjust for differences at baseline on the 2-week changes in SBP, baseline SBP was added to this model. Following the inclusion of this variable in the multivariate model, AGTR1 A1166C, age, and baseline SBP were not significantly associated with 2-week change in SBP (all $p > 0.05$), possibly reflecting the limited statistical power of this multivariate model on 31 individuals with 4 variables.

LONG-TERM EFFECTS

Twenty-seven patients completed 24 weeks of treatment. None of the selected gene polymorphisms were significantly associated with changes in blood pressure at 24 weeks. Nevertheless, AGTR1 AA patients experienced a nonsignificantly greater decrease in blood pressure compared with AC patients (-6.1 ± 4.2 vs -4.3 ± 2.6 mm Hg vs -2.4 ± 3.5 mm Hg; $p = 0.5$ and $p = 0.6$, respectively), despite being treated with similar doses of candesartan at the end of the study (20.7 ± 3.6 mg vs 17.0 ± 3.0 mg; $p = 0.44$). AC carriers experienced a significantly greater decrease in NT-proBNP compared with AA carriers (-151.4 [-207 ; -19.8] ng/L vs 147.3 [-61.3 ; 882.9] ng/L; $p = 0.03$) (Table 4) at 24 weeks. Similarly, AC carriers exhibited a trend for a decrease in hsCRP (-0.8 [-2.2 ; -0.03] mg/L), while AA carriers experienced an increase (0.2 [-1.8 ; 5.3] mg/L; $p = 0.09$). There were no other significant relationships between any of the gene polymorphisms and changes in NT-proBNP or hsCRP (Table 4). When combining

age and A1166C polymorphism in an ANOVA, neither was significantly related to changes in NT-proBNP.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study exploring the association between selected gene polymorphisms and the response to an ARB in patients with heart failure. This exploratory proof-of-concept pilot study provides many novel findings. We found that the A1166C genetic polymorphism of the AGTR1, the receptor blocked by candesartan, which mediates most of the physiological effects of angiotensin II, may be associated with the response to this agent. More specifically, we observed an association between the AGTR1 A1166C gene polymorphism and short-term reductions in blood pressure and long-term reductions in NT-proBNP in response to candesartan. Our results suggest that carriers of the C allele may be less sensitive to the ATR1 antagonistic effects of low doses of candesartan, as demonstrated by the modest impact on blood pressure, but that targeting high doses of candesartan in these patients may be beneficial, as we observed a decrease in NT-proBNP in these patients, which is an established prognostic marker in heart failure (28). Our small sample size limits the conclusions that could be drawn from

multivariate analyses. Nevertheless, our results are particularly relevant in the context of the current dilemma faced by clinicians regarding the identification of patients who are most likely to benefit from the addition of an ARB once receiving an ACE inhibitor and a β -blocker. Of the many single nucleotide polymorphisms of the AGTR1 identified,

the A1166C variant, located in the 3'-untranslated region of the ATR1, has been the most widely studied (29). Although the C allele has been associated with increased sensitivity to angiotensin II (30), greater response to angiotensin II (31), aortic stiffness (29), myocardial infarction (32), hypertension (33), and left ventricular hypertrophy in hypertensive patients (29), the physiological significance of this polymorphism remains uncertain. Because it is located in an untranslated region, this polymorphism could be in linkage disequilibrium with another, yet unidentified, functional variant of the gene. As C carriers may be more sensitive to angiotensin II (30, 31), they should be less likely to be affected by the rightward shift to the agonist dose–effect curves of angiotensin-II induced by the competitive antagonistic effects of candesartan (34). This would explain the more modest reduction in blood pressure observed in these patients following the initiation of candesartan. Our findings are consistent with observations from a study of hypertensive patients on a high-salt diet that demonstrated that the CC1166 patients experienced a more modest decrease during the intravenous administration of EXP3174 (the active metabolite of losartan) (35). Furthermore, we found that C carriers experienced the greatest decrease in NT-proBNP, a biomarker of left ventricular remodeling (36). The decrease in NT-proBNP suggests that these patients may particularly benefit from high doses of candesartan (28). This is consistent with observations from clinical investigations using irbesartan in hypertensive subjects presenting with left ventricular hypertrophy (11). Indeed, Kurland et al. (11) demonstrated that C carriers experienced the greatest benefit of irbesartan in regard to ventricular remodeling through a greater reduction in left-ventricular mass index. Taken together, these and our results suggest that patients carrying the C allele of the A1166C gene polymorphism experience the greatest

benefit from ARBs in regard to ventricular remodeling. Interestingly, in our study, the decrease in NT-proBNP in C carriers was accompanied by a trend for a decrease in hsCRP, another established prognostic marker in patients with heart failure (37). In our study, no patients carried the AGTR1 CC1166 genotype. Whether homozygotes with heart failure for the C1166 allele experience greater benefit from candesartan compared with AC1166 carriers requires further investigation. Results regarding the impact of the AGTR1 A1166C on the response to ARBs in other populations have been inconsistent. Miller et al. (38) found that in young, healthy normotensive individuals, C carriers experienced a greater decrease in blood pressure following administration of a single oral dose of losartan, while 2 other studies using telmisartan (39) and irbesartan (40) in hypertensive patients failed to show any association between the A1166C polymorphism and long-term blood pressure reduction. The reasons for these discrepancies are not well understood. RAAS activation and regulation are markedly different in heart failure. Indeed, heart failure is associated with marked activation of the RAAS compared with activation of the RAAS in healthy individuals (41, 42), while RAAS suppression causes a more modest effect on blood pressure in patients with heart failure (3) than in hypertensive or prehypertensive patients (43,44). Furthermore, heart failure is associated with a local increase in cardiac angiotensin II formation, which appears to be more dependent on local factors, such as end diastolic stress, rather than on the circulating concentrations of the other RAAS components (45). In addition, in long-term studies (39, 40), multiple antihypertensives were used concomitantly with the ARB to reach a target blood pressure, possibly masking any association between the genetic polymorphism and

the response to the ARB. Finally, in our study, all patients received an ACE inhibitor and a β -blocker at baseline, which also have effects on RAAS activation (46, 47).

STRENGTHS AND LIMITATIONS

Our study has several strengths. First, we investigated a patient population with a fairly homogenous background therapy, where all patients were treated with an ACE inhibitor and a β -blocker, the standard of care for heart failure. In addition, we did not limit the study to a single genetic polymorphism, but instead investigated 10 polymorphisms related to the neurohormonal pathway blocked by candesartan. Finally, our study evaluated established prognostic markers of heart failure. Nonetheless, it is important to highlight that there is currently no established surrogate marker of drug efficacy in heart failure, such as blood pressure is in hypertension. The most important limitation of this substudy is its small sample size. Consequently, we did not correct for multiple testing and had limited power for multivariate analyses. Moreover, although we did not observe a relationship between any of the other gene polymorphisms studied and the response to candesartan, we cannot exclude an effect of these gene polymorphisms on the response to candesartan.

5. Conclusions

In conclusion, the results of this proof-of-concept clinical investigation suggest that the variability in the response to candesartan appears to be, at least in part, attributable to genetic variations. Our results suggest that AA1166 homozygotes may be more hemodynamically sensitive to the addition of candesartan when already treated with an ACE inhibitor and a β -blocker. Conversely, C1166 carriers may constitute a group of individuals who particularly benefit from treatment with high-dose candesartan. These novel findings require further investigation in a larger population before such strategy is implemented in clinical practice.

Table Legends

Table 1: Characteristics of the study population.

Table 2: Genotype frequencies of the study population.

Table 3: Association between genetic polymorphisms and changes in systolic and diastolic blood pressure after 2 week of candesartan

Table 4: Association between selected gene polymorphisms on 24-week changes in NT-proBNP and hsCRP

Table 1. Characteristics of the Study Population^a	
Men, %	93.5
Age, y ^b	63.0 ± 1.5
Ischemic heart failure	90.3
LVEF ^b	26.8 ± 1.4
NYHA functional class	
II	64.5
III	35.5
IV	0.0
Atrial fibrillation	19.4
Diabetes	38.7
Hypertension	29.0
Drugs, %	
ACE inhibitor	100.0
β-blocker	100.0
digitalis glycoside	54.8
furosemide	71.0
spironolactone	22.6
<p>ACE = angiotensin-converting enzyme; HF = heart failure; LVEF = left ventricular ejection fraction; NYHA = New York Heart Association.</p> <p>^aN = 31.</p> <p>^bContinuous data are presented as mean ± SE.</p>	

Table 2. Genotype Frequencies in the Study Population ^a						
Gene	A	B	A/A, n (frequency)	A/B, n (frequency)	B/B, n (frequency)	n
<i>ACE</i>	I	D	4 (0.13)	16 (0.52)	11 (0.36)	31
<i>AGTR1</i>	A1166	C1166	13 (0.42)	18 (0.58)	0	31
<i>AGT</i>	Met235	Thr235	6 (0.19)	17 (0.55)	8 (0.26)	31
<i>AGT</i>	Thr174	Met174	21 (0.68)	9 (0.29)	1 (0.03)	31
<i>eNOS</i>	T-786	C-786	8 (0.26)	19 (0.61)	4 (0.13)	31
<i>eNOS</i>	Glu298	Asp298	12 (0.40)	13 (0.43)	5 (0.17)	30
<i>ADRB2</i>	Gln27	Glu27	13 (0.42)	11 (0.36)	7 (0.23)	31
<i>BDKRB2</i>	D	I	12 (0.39)	12 (0.39)	7 (0.23)	31
<i>CYP11B2</i>	T-344	C-344	9 (0.29)	11 (0.36)	11 (0.36)	31
<i>ADD1</i>	Gly461	Trp461	21 (0.68)	10 (0.32)	0	31
^a All gene polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium except the <i>AGTR1</i> A1166C (p = 0.028).						

Table 3. Association Between Genetic Polymorphisms and Changes in Systolic and Diastolic Blood Pressure after 2 Weeks of Candesartan^a

Gene Polymorphism	Systolic BP Change (p value)	Gene Polymorphism	Diastolic BP Change (p value)
<i>AGTR1</i>	0.04	<i>AGTR1</i>	0.005
<i>eNOS298</i>	0.20	<i>AGT174</i>	0.15
<i>AGT174</i>	0.24	<i>BDKRB2</i>	0.18
<i>ACE</i>	0.31	<i>ADRB2</i>	0.21
<i>ADRB2</i>	0.32	<i>ADD1</i>	0.35
<i>BDKRB2</i>	0.36	<i>eNOS298</i>	0.36
<i>ADD1</i>	0.41	<i>ACE</i>	0.55
<i>eNOS786</i>	0.68	<i>CYP11B2</i>	0.71
<i>AGT235</i>	0.79	<i>eNOS786</i>	0.81
<i>CYP11B2</i>	0.99	<i>AGT235</i>	0.87

BP = blood pressure.

^aPresented in a rank order of significance. Comparisons by analysis of variance controlling for dose; main effects p values are reported (N = 31).

Table 4. Association Between Selected Gene Polymorphisms on 24-Week Changes in NT-proBNP and hsCRP^a

Gene Polymorphism	NT-proBNP Change (p value)	Gene Polymorphism	hsCRP Change (p value)
<i>AGTR1</i>	0.03	<i>eNOS298</i>	0.06
<i>BDKRB2</i>	0.31	<i>AGTR1</i>	0.09
<i>ADD1</i>	0.54	<i>CYP11B2</i>	0.11
<i>AGT235</i>	0.63	<i>eNOS786</i>	0.17
<i>CYP11B2</i>	0.63	<i>ACE</i>	0.38
<i>AGT174</i>	0.66	<i>ADRB2</i>	0.49
<i>eNOS298</i>	0.73	<i>BDKRB2</i>	0.55
<i>eNOS786</i>	0.75	<i>AGT235</i>	0.64
<i>ADRB2</i>	0.84	<i>ADD1</i>	0.66
<i>ACE</i>	0.86	<i>AGT174</i>	0.72

hsCRP = high-sensitivity C-reactive protein; NT-proBNP = N-terminal proB-type natriuretic peptide.

^aComparisons by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (n = 27).

References

1. Martineau P, Goulet J. New competition in the realm of renin–angiotensin axis inhibition; the angiotensin II receptor antagonists in congestive heart failure. *Ann Pharmacother* 2001;35:71-84. DOI 10.1345/aph.19307
2. Farquharson CA, Struthers AD. Gradual reactivation over time of vascular tissue angiotensin I to angiotensin II conversion during chronic lisinopril therapy in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:767-75.
3. McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 2003;362:767-71.
4. Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1667-75.
5. Lee DS, Pencina MJ, Benjamin EJ, et al. Association of parental heart failure with risk of heart failure in offspring. *N Engl J Med* 2006;355:138- 47.
6. Rice GI, Jones AL, Grant PJ, Carter AM, Turner AJ, Hooper NM. Circulating activities of angiotensin-converting enzyme, its homolog, angiotensin-converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension* 2006;48:914-20.
7. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2019-26.

8. Ozdemir V, Williams-Jones B, Cooper DM, Someya T, Godard B. Mapping translational research in personalized therapeutics: from molecular markers to health policy. *Pharmacogenomics* 2007;8:177-85.
9. White M, Lepage S, Lavoie J, et al. Effects of combined candesartan and ACE inhibitors on BNP, markers of inflammation and oxidative stress, and glucose regulation in patients with symptomatic heart failure. *J Card Fail* 2007;13:86-94.
10. Hallberg P, Lind L, Michaelsson K, et al. B2 bradykinin receptor (B2BKR) polymorphism and change in left ventricular mass in response to antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *J Hypertens* 2003;21:621-4.
11. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin II type 1 receptor gene are related to change in left ventricular mass during antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *J Hypertens* 2002;20:657-63.
12. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2)-344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens* 2002;15:389-93.
13. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.

14. Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, et al. Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002;39:191-6.
15. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation* 2003;107:1598-602.
16. Forleo C, Resta N, Sorrentino S, et al. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 2004;117:451-8.
17. Fernandez-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert L. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in essential hypertension: relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 1998;11:439- 44.
18. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, et al. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* 1998;97:569-75.
19. Braun A, Kammerer S, Bohme E, Muller B, Roscher AA. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:234- 40.
20. Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E. G-protein beta3 subunit and alpha-adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke* 2001;32:822-9.
21. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32:521-6.

22. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004;147:516-21.
23. Kaye DM, Smirk B, Williams C, Jennings G, Esler M, Holst D. Beta-adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. *Pharmacogenetics* 2003;13:379-82.
24. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993;3:120-1.
25. Araujo MA, Goulart LR, Cordeiro ER, et al. Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes in myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2005;103:27-32.
26. Hingorani AD, Brown MJ. A simple molecular assay for the C1166 variant of the angiotensin II type 1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:725-9.
27. Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens* 1997;15:1385-8.
28. Anand IS, Florea VG, Fisher L. Surrogate end points in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1414-21.
29. Baudin B. Polymorphism in angiotensin II receptor genes and hypertension. *Exp Physiol* 2005;90:277-82.
30. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MM, Daemen MJ, de Leeuw PW. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor

A(1166)C polymorphism in essential hypertensives on a high-sodium diet. *Hypertension* 2000;36:411-6.

31. van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, et al. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 2000;35:717-21.
32. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994;344:910-3.
33. Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, et al. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 1999;33:844-9.
34. Belz GG. Angiotensin II dose-effect curves and Schild regression plots for characterization of different angiotensin II AT1 receptor antagonists in clinical pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56:3-10.
35. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MJ, de Leeuw PW. Genetic contribution to the acute effects of angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Hypertens* 2005;23:753-8.
36. de Denus S, Pharand C, Williamson DR. Brain natriuretic peptide in the management of heart failure: the versatile neurohormone. *Chest* 2004;125:652-68.
37. Anand IS, Latini R, Florea VG, et al. C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* 2005;112:1428-34.
38. Miller JA, Thai K, Scholey JW. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 1999;56:2173-80.

39. Redon J, Luque-Otero M, Martell N, Chaves FJ. Renin–angiotensin system gene polymorphisms: relationship with blood pressure and microalbuminuria in telmisartan-treated hypertensive patients. *Pharmacogenomics J* 2005;5:14-20.
40. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type 1 antagonist treatment in hypertensive patients. *J Hypertens* 2001;19:1783-7.
41. Bleske BE. Evolution and pathophysiology of chronic systolic heart failure. *Pharmacotherapy* 2000;20(suppl):349S-58S.
42. Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, et al. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 1990;82:1724-9.
43. Julius S, Nesbitt SD, Egan BM, et al. Feasibility of treating prehypertension with an angiotensin-receptor blocker . *N Engl J Med* 2006;354: 1685-97.
44. McClellan KJ, Goa KL. Candesartan cilexetil. A review of its use in essential hypertension. *Drugs* 1998;56:847-69.
45. Serneri GG, Boddi M, Cecioni I, et al. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ Res* 2001;88:961-8.
46. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksbus J, Snapinn S. Effects of enalapril and neuroendocrine activation on prognosis in severe congestive heart failure (follow-up of the CONSENSUS trial). *Am J Cardiol* 1990;66:40D- 4D.

47. Cohen Solal A, Jondeau G, Beauvais F, Berdeaux A. Beneficial effects of carvedilol on angiotensin-converting enzyme activity and renin plasma levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;6:463-6.

ANNEXE 3

Association between renal function and CYP3A5 genotype in heart transplant recipients treated with calcineurin inhibitors.

publié dans:

Journal of Heart and Lung Transplantation

2011

Association between renal function and CYP3A5 genotype in heart transplant recipients treated with calcineurin inhibitors.

Simon de Denus, B.Pharm, MSc, PhD,^{a,b} Marcin Zakrzewski, MD,^{a,c} Amina Barhdadi, MD^b Marie-Hélène Leblanc, MD,^d Normand Racine, MD,^b François Bélanger, MD,^c Michel Carrier, MD,^b Anique Ducharme, MD,^b Marie-Pierre Dubé, PhD,^b Jacques Turgeon, B.Pharm, PhD,^{a,c} and Michel White, MD^b

^aFaculty of Pharmacy. Université de Montréal, Montreal, Quebec;

^bMontreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal, Quebec;

^cCentre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec; and

^dHôpital Laval, Québec, Quebec.

Address for correspondence to: Drs. Simon de Denus or Michel White: Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger Street, Montréal, Quebec, H1T 1C8.

Short Title: CYP3A5 and renal function in heart transplantation

Résumé

Le dysfonctionnement rénal post-transplantation est un processus en grande partie irréversible qui est associée à une mortalité accrue. L'expression rénale de l'isoenzyme 3A5 du cytochrome P450 (CYP3A5) et de la P-glycoprotéine, un transporteur d'efflux, est inversement associée à de la néphrotoxicité induite par les inhibiteurs de la calcineurine. Des variantes génétiques des gènes codant pour cette isoenzyme (CYP3A5) et ce transporteur (ABCB1) sont associées à la fonction rénale après une transplantation cardiaque. Cette étude de cohorte rétrospective incluait des individus survivant une transplantation cardiaque et qui ont reçu des inhibiteurs de la calcineurine au cours de leur suivi. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'impact des certaines variantes génétiques communes au niveau du ABCB1 (G2677T / A et C3435T) et du CYP3A5 (*1/*3) sur les changements du taux de filtration glomérulaire estimé (eGFR). Les données sur la fonction rénale ont été recueillies à la sortie de l'hôpital après la transplantation cardiaque, à 3, 6, 12, 18 et 24 mois, et à chaque année, jusqu'à un maximum de neuf ans, par la suite. L'objectif secondaire était l'évaluation du ratio concentration/dose/kg de la ciclosporine et du tacrolimus pendant le suivi. Un total de 160 patients a pris part à l'étude. Les patients étaient majoritairement des hommes (79,4%) et l'âge médian du groupe était de 53,2 ans. Le suivi moyen était de 4,2 ans. Après ajustement pour les facteurs prédictifs indépendants de l'eGFR au cours du suivi, la variante génétique *1/*3 du CYP3A5 a été associée de façon significative avec l'eGFR après transplantation ($p = 0,0002$). Plus précisément, au cours du suivi, les non-expresssurs du CYP3A5 (*3/*3) ont eu un eGFR inférieur comparativement aux porteurs

de la variante *1. De plus, les patients génotypés *3/*3 nécessitaient des doses plus faibles en tacrolimus, tel que illustré par un ratio concentration/dose plus élevée de tacrolimus ($p = 0,004$). En conclusion, le polymorphisme génétique *1/*3 du CYP3A5 est un marqueur génétique prometteur pour identifier les greffés du cœur les plus susceptibles de développer une insuffisance rénale pendant le traitement par les inhibiteurs de la calcineurine. Cette variante pourrait aussi s'avérer utile pour guider le dosage du tacrolimus.

Abstract

Background. The renal expression of the cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) isoenzyme and of the ATP-binding cassette (ABC) efflux transporter p-glycoprotein is inversely associated with calcineurin-induced nephrotoxicity. The aim of this study was to evaluate the association between polymorphisms of the genes encoding these proteins and the long-term renal function of heart transplant recipients treated with calcineurin inhibitors.

Methods. We performed a retrospective cohort study of 160 heart transplant recipients from two institutions who were discharged alive after transplant and who received a calcineurin inhibitor during follow-up. The aim of this study was to evaluate the impact of common variants of the genes encoding this isoenzyme (*CYP3A5**1 and *3) and this transporter (*ABCB1* G2677T/A and C3435T) on the renal function of these patients following the heart transplantation. The primary endpoint of the study was changes in the estimated glomerular filtration rate (eGFR) at hospital discharge, 3, 6, 12, 18, 24 months following heart transplant, and then every year for up to nine years.

Results. After adjusting for independent predictors of eGFR during follow-up, *CYP3A5* was significantly associated with eGFR following transplantation ($P=0.0002$), with carriers of the *CYP3A5**1 allele exhibiting a higher eGFR. None of the *ABCB1* variants or haplotypes was associated with eGFR following transplantation.

Conclusions. The *CYP3A5*1* genetic polymorphism is a promising marker to identify heart transplant recipients least likely to develop renal dysfunction during long-term treatment with a calcineurin inhibitor.

Keywords: Transplantation; Pharmacogenomics; Tacrolimus; Cyclosporine; Nephrotoxicity; CYP3A5; ABCB1

1. Introduction

Renal dysfunction represents a major adverse effect of the calcineurin inhibitors, cyclosporine and tacrolimus.[1,2] Approximately 5 to 10% of patients will develop end stage renal failure in the 5 years following transplant [3-5] which is associated with a doubling to quadrupling of death.[4,6] Risk factors for developing progressive renal dysfunction after a heart transplantation include age, [3,6-8] sex, [3,6] pretransplant diabetes [3,6-8] and hypertension.[6-8] The association between concentrations of calcineurin inhibitors and post heart transplant renal dysfunction has been inconsistent.[3,6] Considerable uncertainty remains in the identification of patients prior to transplant who are most likely to develop this adverse effect and who could possibly be candidate for calcineurin inhibitor-sparing treatment strategies.[9]

Heart transplant recipients are a unique population to study the impact of selected genetic polymorphisms on the nephrotoxic effects of calcineurin inhibitors because these patients, contrary to gut, liver or kidney transplant recipients, are not recipients of an organ implicated in the absorption, metabolism or elimination of calcineurin inhibitors, and because potential discordances in genotypes are avoided between the kidneys and these key organs of drug pharmacokinetics.[10-12] Previous studies have suggested that genetic polymorphisms of *ABCB1*, which codes for P-glycoprotein (P-gp), an ATP-binding cassette (ABC) efflux transporter,[13] and *CYP3A5*, which codes for the cytochrome P450 (CYP) 3A5 isoenzyme,[14] could influence the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors, both substrates of these proteins.[15-17] Because the renal expression of CYP3A5, the most abundant member of CYP3A family in the kidneys,[17-

19] and P-gp inversely correlates with the risk of calcineurin inhibitor-induced nephropathy,[20-24] we conducted a study to test the hypothesis that variants of these genes are associated with the evolution of renal function of individuals treated with a calcineurin inhibitor following the heart transplantation.

2. Method

Study Patients

We conducted a retrospective cohort study of patients who received a heart transplantation at the Montreal Heart Institute and the Quebec Heart Institute who had provided consent to be part of the RETEB (Réseau d'Échange de Tissus et d'Échantillons Biologiques). The RETEB is a network which collects and makes available blood and tissue samples for research purposes. Patients discharged alive and who received calcineurin inhibitors during follow-up were included in the current study. Clinical data were obtained through the RETEB data bank, clinical databases, and a retrospective chart review. Data were collected regarding patients characteristics prior to heart transplant, at hospital discharge, 3, 6, 12, 18, 24 months following heart transplant, and then every year for up to nine years. Follow-up visits during which the calcineurin inhibitor was stopped, temporarily or permanently, were not included in the analyses. This specific pharmacogenetic study was approved by the Scientific Research Committee and the Ethics Committee of the Montreal Heart Institute.

Genetic analysis

DNA was extracted from myocardial tissue of the recipient obtained from the RETEB using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen Inc.[®], Mississauga, Canada). Genotyping for *ABCB1* G2677T/A (rs2032582), C3435T (rs1045642) and *CYP3A5**3 (rs776746) was performed based on previously published work.[25,26] Briefly, these polymorphisms were genotyped using the polymerase chain reaction/restriction fragment

length polymorphism (PCR/RFLP) method. The sense and the anti-sense oligonucleotide primers are available in Table 1. PCR reactions were performed in a total volume of 25 L with 0.8 M of each primer (0.4 M for G2677T/A), 0.2 M of each dNTP (0.3 M for *CYP3A5*3*), 1.5mM MgCl₂ (2mM for G2677T/A), 1X PCR buffer (Invitrogen[®], Carlsbad, USA) and 1 UI of Taq polymerase (Invitrogen[®], Carlsbad, USA). PCR amplification consisted of an initial denaturation step for 2 min at 94°C (7 min for *CYP3A5*3*) followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec (1 min for *CYP3A5*3*), annealing at 60°C for 30 sec (55°C for 1 min for *CYP3A5*3*) and extension at 72°C for 1 min (30 sec for G2677T/A). The terminal elongation was carried out at 72°C for 7 min. The PCR-generated DNA fragments were thereafter digested with restriction enzymes (3 UI of BanI for G2677T, 3.5 UI of BsrI for G2677A, 1 UI of MboI for C3435T and 5 UI of SspI for *CYP3A5*3*), separated on a 2% agarose gel and visualized under UV light.

Study endpoints

The primary endpoint of the study was changes in the estimated glomerular filtration rate (eGFR), as calculated by the modification of diet in renal disease (MDRD) simplified formula,[27] at hospital discharge, 3, 6, 12, 18, 24 months following heart transplant, and then every year for up to nine years.

Statistical analyses

Continuous data are presented as mean±SD or median (25th; 75th percentiles) where appropriate, and categorical variables are presented as percentages. Pretransplant

and discharge eGFR were compared between genotypes using the Kruskal-Wallis one-way ANOVA. Allele and genotype frequencies were calculated for all polymorphisms and the haplotype frequencies were inferred for the *ABCB1* polymorphisms using the Expectation Maximisation Algorithm. We tested the Hardy Weinberg equilibrium for each of these polymorphism and we tested the linkage disequilibrium between them. The chi-square goodness-of-fit test was used to test markers for Hardy Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium.

To evaluate the association between the candidate genetic polymorphisms, haplotypes and renal function, we used the general linear mixed model for the regression analysis of correlated data. We used the SAS mixed procedure which offers repeated measures analyses that account for within subject covariability and employs a more general covariance structure approach. We choose the autoregressive covariance structure provided by mixed procedure because the measures are equally spaced over time for each subject. We choose also the likelihood based method in Proc MIXED because the data are unbalanced by design. Factors that were associated with renal function during a univariate analysis ($P < 0.05$) were included in the final multivariate model which included all genetic polymorphisms. The covariates evaluated were age at discharge, sex, pre-transplant diabetes and hypertension. SAS/Genetics and NCSS were used for the statistical analyses. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

A total of 160 patients were included. Demographic characteristics of the patients included in the study are presented in Table 2. Patients were mainly males (79.4%), with a median age of 53.2 (43.5; 58.2) years and were mostly Caucasians (98.1%). A total of 47.5% of patients had ischemic heart failure prior to transplant with a median left ventricular ejection fraction of 20 (15; 25) %. The patients presented moderate renal dysfunction prior to transplant with an estimated GFR of 56.2 (46.0; 70.1) mL/min/1.73 m². There was no significant difference in pretransplant eGFR between genotypes ($P>0.27$). All patients were receiving standard immunosuppressive treatment at the time of discharge from the hospital. The calcineurin inhibitor was temporarily stopped for one patient at hospital discharge, but it was reinitiated between that time and three month follow-up. Of the patients treated with cyclosporine at discharge, 59 (47.2%) received tacrolimus at some point during follow-up, while 2 (5.9%) of patients initially treated with tacrolimus received cyclosporine.

Table 3 describes the frequency of the genetic polymorphisms in the study population. No genetic polymorphism deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium (P value >0.05). We observed strong linkage disequilibrium between the T alleles of genetic polymorphisms from the *ABCB1* gene ($\chi^2=80.6$; $P<0.0001$). The *ABCB1* G2677-C3435 and T2677-T3435 haplotypes were the most frequent haplotypes, with frequencies of respectively 46.2% and 38.2%. Table 4 describes inferred haplotypes for the *ABCB1* gene.

The mean follow-up was 4.2 ± 2.7 years. There was no difference in follow-up duration between any of the studied genotypes. There was no significant difference regarding cyclosporine or tacrolimus concentrations between the different *CYP3A5* or *ABCB1* C3435T genotypes. In regards to the *ABCB1* G2677T/A polymorphism, no difference was observed regarding tacrolimus concentrations, but a significant difference was observed regarding cyclosporine concentrations ($P=0.004$). Figure 1 illustrates calcineurin inhibitor through concentrations according to genotype during the follow-up.

Predictors of renal function after transplant

As shown in Table 5, *CYP3A5* was strongly associated with post transplant eGFR ($P=0.004$) in the univariate analysis. Neither of the *ABCB1* polymorphisms was associated with eGFR on univariate analysis. Among clinical variables, age ($P<0.0001$), gender ($P=0.02$) and a prior history of hypertension ($P=0.0002$) were associated with post transplant eGFR. Pre-transplant diabetes was not associated with eGFR during follow-up, perhaps as the results of the limited number of diabetics ($n=16$).

After adjusting for these independent predictors of eGFR during follow-up (Table 5), *CYP3A5* genotype remained strongly associated with eGFR following transplant ($P=0.002$, Figure 2), with carriers of the *CYP3A5*1* allele having a higher eGFR. This nephroprotective effect appeared early, with *CYP3A5*1* carriers demonstrating a higher eGFR at discharged following the heart transplantation ($P=0.03$), and was sustained throughout follow-up. Neither *ABCB1* G2677T/A nor C3435T polymorphism were associated with post transplant renal function after adjusting for these possible

confounders. Similarly, none of the *ABCB1* haplotypes was associated with eGFR during follow-up (data not shown).

The association between *CYP3A5* and renal function was apparent for patients treated with cyclosporine or tacrolimus at hospital discharge ($p < 0.05$ for both subgroups). Importantly, the number of patients who received sirolimus during follow-up concomitantly with a calcineurin inhibitor did not differ according to *CYP3A5* genotype (*CYP3A5**1 carriers: 6.3% vs *CYP3A5**3/*3: 17.4%; $p = 0.47$).

4. Discussion

Calcineurin inhibitor-induced nephropathy is a multifactorial phenomenon. Acute renal dysfunction is the result of a deleterious vasoconstriction of the afferent renal arteriole secondary to an imbalance between vasodilating and vasoconstriction substances.[28,29] Chronically, it evolves into irreversible damage characterized by interstitial fibrosis, tubular atrophy, intimal hyperplasia and arteriopathy.[28,29] Because clinical characteristics and the concentrations of calcineurin-inhibitors do not completely account for the risk of this deadly[4,6] adverse drug reaction, the identification of predictors of post-transplant renal dysfunction could have important therapeutic implications for heart transplant recipients.

This study provides the first data of an association between *CYP3A5* genotype and renal function in a cohort of heart transplant recipients treated by calcineurin inhibitors. More specifically, we have demonstrated that the functional *CYP3A5*1* allele is nephroprotective in patients treated with calcineurin inhibitors. This effect appeared early following transplantation and was sustained during follow-up. Moreover, the impact of the *CYP3A5* polymorphism on post-transplant renal function remained after adjusting for known predictors of renal dysfunction. Importantly, there was no significant difference in pre-transplant renal function between *CYP3A5*1* carrier and non carriers, or any other of the genetic polymorphisms, which indicates that this association was independent of pre-transplant renal function. We hypothesize that this nephroprotective effect could be attributed to the known increases in renal *CYP3A5* activity and calcineurin inhibitor metabolism of *CYP3A5*1* carriers,[17] which would lead to lower concentrations of these

nephrotoxic agents in the kidneys. Oppositely, homozygotes for the *CYP3A5**3 allele, a splice variant in intron 3 (A6986G) that produces a premature stop codon and a defect in the *CYP3A5* expression in the kidney,[18] would be expected to result in higher renal concentrations of these nephrotoxic agents and, as we observed, worsening renal function. Because plasma concentrations of calcineurin inhibitors were similar during follow-up between carriers and non carriers of the *CYP3A5**1 allele, our results also support the concept that, for a given drug plasma concentration, tissue concentrations between individuals could markedly differ depending on the expression of metabolizing enzymes of this drug in a tissue, thereby potentially influencing its efficacy and/or toxicity. In addition, although the exact nephrotoxic potential of the multiple cyclosporine and tacrolimus metabolites remains to be established, it can be hypothesized that *CYP3A5* genotype could modify the profile of the metabolites of cyclosporine or tacrolimus, either in the blood, following their metabolism in the liver, or specifically in the kidneys.[30] Our data are consistent with a previous study reporting a decreased renal expression of *CYP3A5* in patients with calcineurin inhibitor-induced nephropathy compared to control patients with various renal diagnoses.[24] Our results contrast with a recent report by Klauke, who found no association between *CYP3A5* and post transplant renal insufficiency in a case-control study (n=106).[31] These discrepancies could be attributed to a different study design and to the fact that the evaluation of a dichotomous variable such as the presence or absence of renal insufficiency provides more limited power than the evaluation of a continuous variable such as eGFR.

Although an important number of *ABCB1* genetic polymorphisms have been identified,[32] two have been most widely studied, the G2677T/A and C3435T. The

ABCB1 G2677T/A polymorphism in exon 21 results in a modification in amino acid sequence (Ala893Ser/Thr) and has been proposed to modulate P-gp activity.[33,34] Although initial reports suggested that the C3435T synonymous polymorphism in exon 26 was associated with P-gp expression,[32] others have challenged these observations.[35] Consistent with these observations, the impact of these genetic variants on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors has been variable in clinical studies.[36-38] Finally, consistent with our results, other studies in heart transplant recipients have found no association between *ABCB1* G2677T and/or C3435T and post heart transplant renal dysfunction[13,31,38] indicating that these two genetic polymorphisms are not major modulators of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity.

Some limitations of our study deserve mention. First, because the study was not a controlled trial, the use and monitoring of the immunosuppressant regimens were left at the discretion of the treating physicians. Also, because of the retrospective nature of our study, blood samples for calcineurin inhibitor concentrations were not obtained or measured in a standardized fashion. Another potential limitation of our study is that our population was almost exclusively constituted of Caucasians. Given that the *CYP3A5*1* allele is found more frequently in individuals of African descent (approximately 45%) and in Asians (15 to 35%), than in Caucasians (5 to 15%), our findings may be even more relevant in these populations and thus require further investigation.[30] Finally, we did not collect data related to dialysis or mortality as part of the study. Given the modest, yet statistically significant impact we observed on renal function, it is unlikely that a single genetic polymorphism will have a major impact on these complex polygenetic outcomes. Nonetheless, should our results be validated by others and additional genetic predictors of

post-transplant renal dysfunction be identified, the development of a comprehensive genetic risk score,[39] which includes multiple risk alleles, could eventually be useful to predict these clinical outcomes.

5. Conclusions

The results of our study indicate that *CYP3A5* genotype is associated with renal function in a large cohort of heart transplant recipients treated with a tacrolimus or cyclosporine. Hence, *CYP3A5* could become an important tool to identify patients who are least likely to develop calcineurin-inhibitor induced renal dysfunction and who could possibly be candidate for calcineurin inhibitor-sparing treatment strategies. Prospective studies are warranted to determine whether a personalized approach that incorporates this genetic marker can improve the quality of the treatment and clinical outcomes of heart transplant recipients.

Table Legends

Table 1: Oligonucleotide Primers Used

Table 2: Baseline Characteristics

Table 3: Genotype Frequencies

Table 4: *ABCB1* Haplotype Inferred Frequencies

Table 5: Predictors of eGFR during Follow-up

Table 1 Oligonucleotide Primers Used

Genetic polymorphism	Oligonucleotide primers
<i>ABCB1</i> G2677T	Sense: 5' TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG 3' Anti-sense: 5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G 3'
<i>ABCB1</i> G2677A	Sense: 5' TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG 3' Anti-sense: 5' GTT TGA CTC ACC TTC CCA G 3'
<i>ABCB1</i> C3435T	Sense: 5' GAT CTG TGA ACT CTT GTT TTC A 3' Anti-sense: GAA GAG AGA CTT ACA TTA GGC 3'
CYP3A5*3	Sense: 5' CAT CAG TTA GTA GAC AGA TGA 3' Anti-sense: 5' GGT CCA AAC AGG GAA GAA <u>A</u> TA 3'

Table 2 Baseline Characteristics

Characteristics	Population (n=160)
Gender males, n (%)	127 (79.4)
Age (years)	53.2 (43.5; 58.2)
Caucasians, n (%)	157 (98.1)
Ischemic etiology, n (%)	76 (47.5)
LVEF, prior to transplantation, %	20 (15; 25)
Diabetes prior to transplantation, n (%)	16 (10.0)
Hypertension prior to transplantation, n (%)	36 (22.5)
eGFR prior to transplantation, mL/min/1.73 m ²	56.2 (46.0; 70.1)
Immunosuppressive regiment at hospital discharge	
Cyclosporine, n (%)	125 (78.1)
Tacrolimus, n (%)	34 (21.3)
Mycophenolate mofetil, n (%)	109 (68.1)
Azathioprine, n (%)	42 (26.3)
Prednisone, n (%)	100 (62.5)
Prednisolone, n (%)	60 (37.5)

Table 3 Genotype Frequencies

Genotype	Number of genotypes	Frequency
<i>ABCB1</i> G2677T/A		
A/G	5	0.03
G/G	54	0.34
G/T	68	0.43
T/T	33	0.21
<i>ABCB1</i> C3435T		
C/C	33	0.21
C/T	93	0.58
T/T	34	0.21
<i>CYP3A5</i>		
*1/*1	2	0.01
*1/*3	14	0.09
*3/*3	144	0.90

Table 4 *ABCB1* Haplotype Inferred Frequencies

ABCB1 Haplotype		
(G2677T/A-C3435T)	Frequency	95%CI
A-C*	1.17×10^{-06}	(0; 1.2×10^{-4})
A-T	0.016	(0.002; 0.029)
G-C	0.462	(0.407; 0.517)
G-T	0.104	(0.070; 0.137)
T-C	0.035	(0.015; 0.055)
T-T	0.384	(0.331; 0.437)

Table 5 Predictors of eGFR during Follow-up

Variable	Univariate		Multivariate	
	F value	P value	F value	P value
<i>ABCB1</i> G2677T/A	0.66	0.58	0.96	0.41
<i>ABCB1</i> C3435T	0.19	0.83	0.10	0.91
<i>CYP3A5</i>	8.31	0.004	9.94	0.002
Age	112.09	<0.0001	112.15	<0.0001
Gender	5.44	0.02	11.67	0.0008
Diabetes	0.16	0.69	-	-
Hypertension	14.14	0.0002	13.42	0.0003

Figure Legends

Figure 1: Mean concentrations of cyclosporine and tacrolimus during follow-up for the *ABCB1* G2677T/A, *ABCB1* C3435T and *CYP3A5* genetic variants.

Figure 2: Estimated glomerular filtration rate before heart transplant and during follow-up for the *CYP3A5* genetic variants.

Figure 1. Median concentration of cyclosporine and tacrolimus during follow-up for the *ABCB1* G2677T/A, *ABCB1* C3435T and *CYP3A5**1/*3 genetic variants.

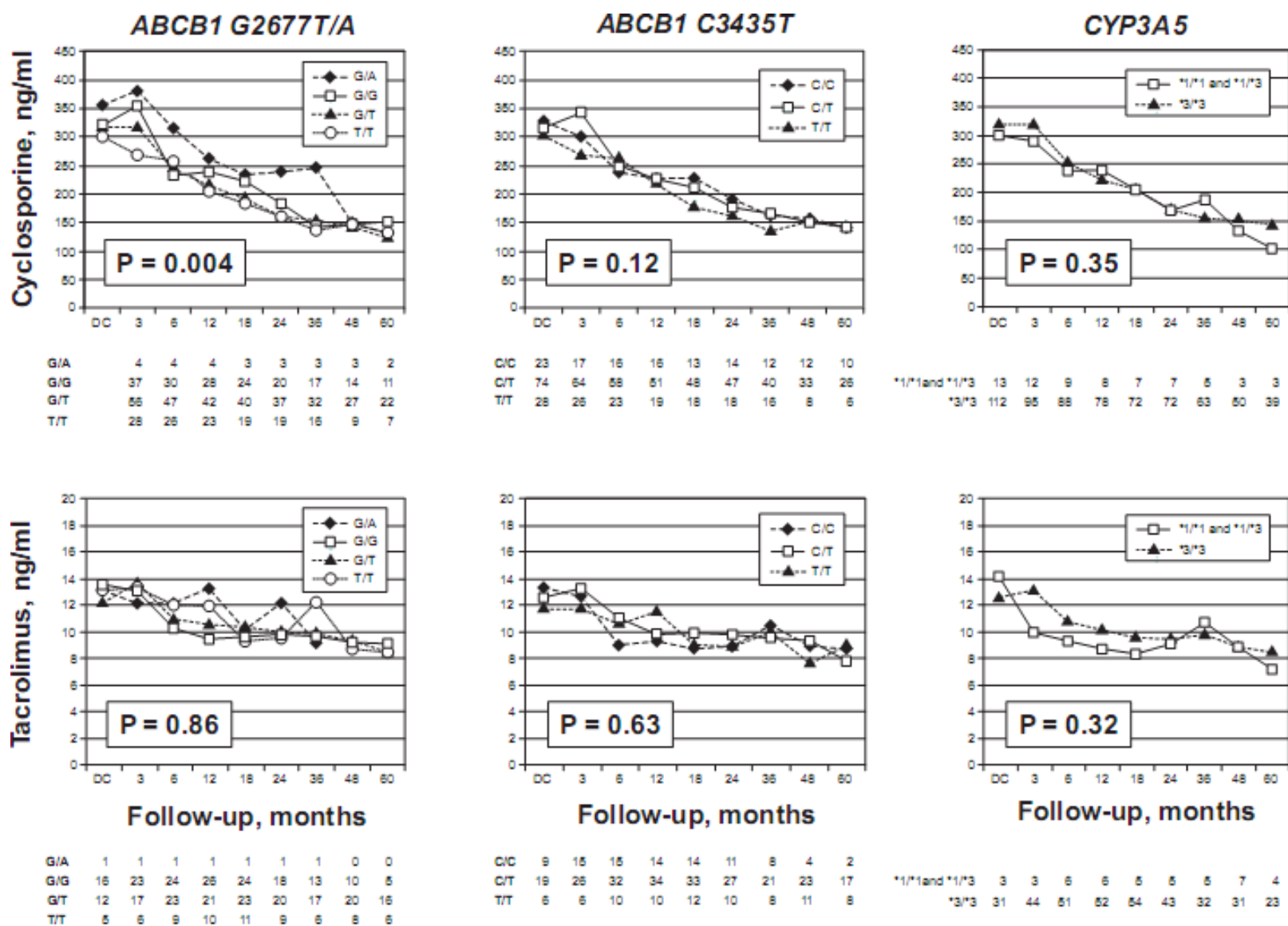
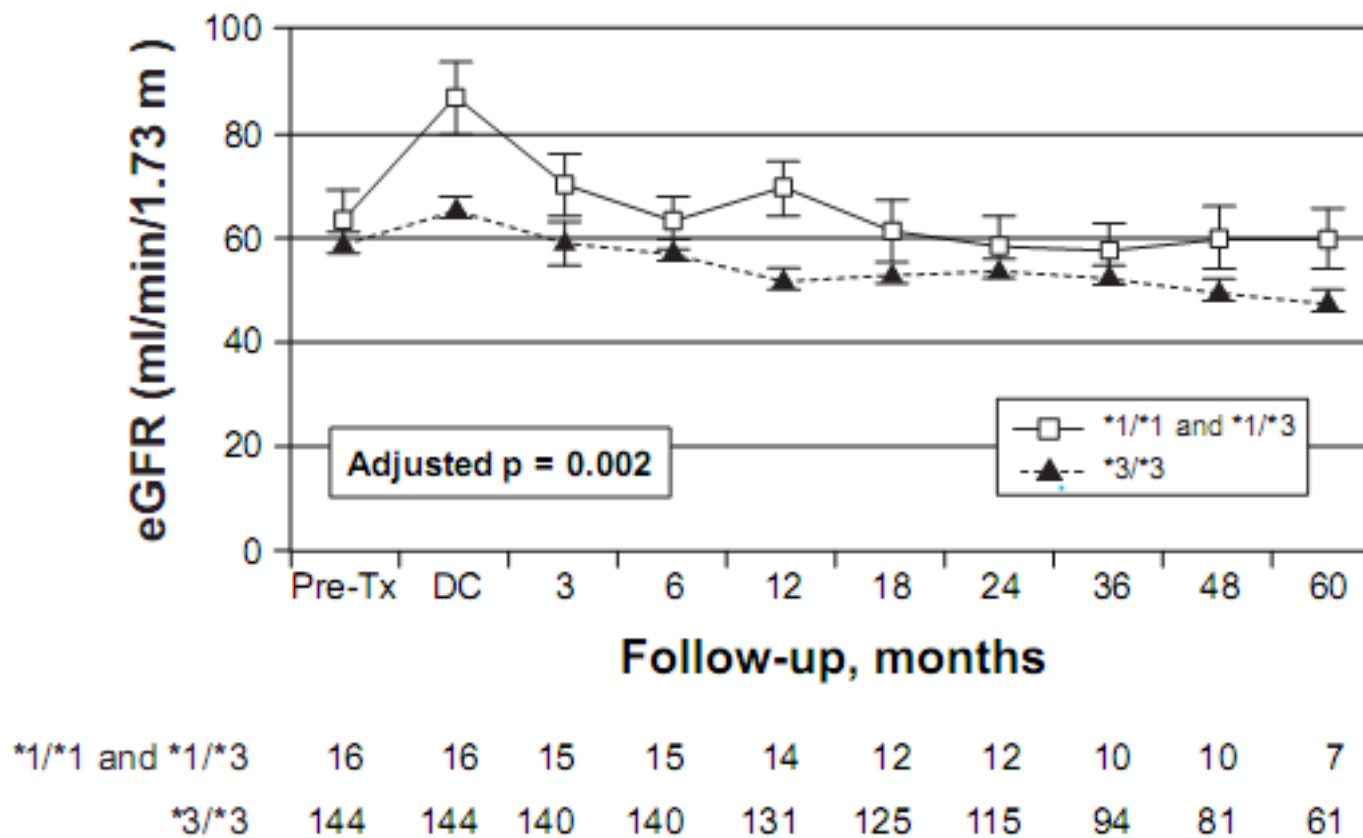


Figure 2. Estimated glomerular filtration rate before heart transplant and during follow-up for the *ABCB1* G2677T/A, *ABCB1* C3435T and *CYP3A5**1/*3 genetic variants.



References

- [1] Kobashigawa JA, Patel J, Furukawa H, et al. Five-year results of a randomized, single-center study of tacrolimus vs microemulsion cyclosporine in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:434-9.
- [2] White M, Haddad H, Leblanc MH, et al. Conversion from cyclosporine microemulsion to tacrolimus-based immunoprophylaxis improves cholesterol profile in heart transplant recipients with treated but persistent dyslipidemia: the Canadian multicentre randomized trial of tacrolimus vs cyclosporine microemulsion. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:798-809.
- [3] Rubel JR, Milford EL, McKay DB, Jarcho JA. Renal insufficiency and end-stage renal disease in the heart transplant population. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:289-300.
- [4] Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003;349:931-40.
- [5] Lindenfeld J, Page RL, 2nd, Zolty R, et al. Drug therapy in the heart transplant recipient: Part III: common medical problems. *Circulation* 2005;111:113-7.
- [6] van Gelder T, Balk AH, Zietse R, Hesse C, Mochtar B, Weimar W. Renal insufficiency after heart transplantation: a case-control study. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2322-6.
- [7] Vossler MR, Ni H, Toy W, Hershberger RE. Pre-operative renal function predicts development of chronic renal insufficiency after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:874-81.

- [8] Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:769-81.
- [9] Ross H, Hendry P, Dipchand A, et al. 2001 Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference on cardiac transplantation. *Can. J Cardiol* 2003;19:620-54.
- [10] Hebert MF, Dowling AL, Gierwowski C, et al. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics* 2003;13:661-74.
- [11] Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1501-11.
- [12] Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:711-25.
- [13] Barnard JB, Richardson S, Sheldon S, et al. The MDR1/ABCB1 gene, a high-impact risk factor for cardiac transplant rejection. *Transplantation* 2006;82:1677-82.
- [14] Zheng H, Webber S, Zeevi A, et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* 2003;3:477-83.

- [15] Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
- [16] Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 2006;112:184-98.
- [17] Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochemical pharmacology* 2004;68:1889-902.
- [18] Givens RC, Lin YS, Dowling AL, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* 2003;95:1297-300.
- [19] Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Molecular pharmacology* 1996;50:52-9.
- [20] Joy MS, Nickleit V, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF. Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy* 2005;25:779-89.
- [21] Koziolk MJ, Riess R, Geiger H, Thevenod F, Hauser IA. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in kidney allografts from cyclosporine A-treated patients. *Kidney Int* 2001;60:156-66.
- [22] del Moral RG, Andujar M, Ramirez C, et al. Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. *Am J Pathol* 1997;151:1705-14.
- [23] del Moral RG, Olmo A, Osuna A, et al. Role of P-glycoprotein in chronic cyclosporine nephrotoxicity and its relationship to intrarenal angiotensin II deposits. *Transplant proc* 1998;30:2014-6.

- [24] Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1963-8.
- [25] Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:169-74.
- [26] van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J: CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002;48:1668-71.
- [27] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
- [28] Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289:535-42.
- [29] Ramirez C, Olmo A, O'Valle F, et al. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol.* 2000;8:161-72.
- [30] Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*;49:141-75.

- [31] Klauke B, Wirth A, Zittermann A, et al. No association between single nucleotide polymorphisms and the development of nephrotoxicity after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:741-5.
- [32] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-8.
- [33] Schaefer M, Roots I, Gerloff T. In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:855-61.
- [34] Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:209-19.
- [35] Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol* 2005;60:159-71.
- [36] Goto M, Masuda S, Kiuchi T, et al. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2004;14:471-8.
- [37] Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004;78:1182-7.

- [38] Taegtmeyer AB, Breen JB, Smith J, et al. ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms do not determine cyclosporin exposure, acute rejection or nephrotoxicity after heart transplantation. *Transplantation* 2010;89:75-82.
- [39] van der Net JB, van Etten J, Yazdanpanah M, et al. Gene-load score of the renin-angiotensin-aldosterone system is associated with coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2008;29:1370-6.

ANNEXE 4

DÉCLARATION DES COAUTEURS

